

**ZYTOIMMUNOLOGISCHES MONITORING NACH
ALLOGENER UND XENOGENER HERZTRANSPLANTATION
IM TIERMODELL**

WOLFGANG ERTEL

1986

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Universität
München

Direktor: Professor Dr.med.Dr.h.c. Walter Brendel

**ZYTOIMMUNOLOGISCHES MONITORING NACH ALLOGENER UND XENOGENER
HERZTRANSPLANTATION IM TIERMODELL**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Ertel

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Brendel

Prof. Dr. A. Baethmann

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. W. Kliner

Prof. Dr. E.P. Rieber

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

23. 7. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

Einführung	1
 Teil A	
1. Einleitung	2
2. Grundlagen xenogener Organtransplantation und Transplantatreaktion	4
2.1 Grundlagen der xenogenen Transplantation	4
2.2 Die Bedeutung präformierter Antikörper bei der xenogenen Abstoßungsreaktion	5
2.3 Xenogene Organtransplantation innerhalb einer zoologischen Familie	5
2.4 Genetische Unterschiede zwischen Fuchs und Hund	6
2.4.1 Gewebetypisierung	6
2.4.2 Erythrozytenantigene	6
2.4.3 Isoenzymmuster	6
2.4.4 Immunelektrophorese	6
2.4.5 Chromosomenanalyse	7
2.5 Grundlagen der Transplantatreaktion	7
2.5.1 Die zelluläre Abstoßungsreaktion	7
2.5.1.1 Immunologie	7
2.5.1.2 Histologie	7
2.5.2 Die humorale Abstoßung	10
2.5.2.1 Immunologie	10
2.5.2.2 Histologie	10
3. Material und Methoden	11
3.1 Versuchstiere	11
3.2 Operative Technik	11
3.2.1 Spender	11
3.2.2 Empfänger	14
3.3 Immunsuppressive Therapie	18
3.3.1 Ciclosporin	18

3.3.2	Cortikosteroide	18
3.3.3	Dosierung	19
3.4	Postoperative Überwachung	20
4.	Ergebnisse	21
4.1	Ergebnisse der allogenen und xenogenen heterotopen Herztrans- plantation	21
4.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen von allogenen und xenogenen Herztransplantaten	24
4.2.1	Allogene Transplantate	24
4.2.2	Xenogene Transplantate	24

Teil B

1.	Einleitung	29
2.	Material und Methoden	30
2.1	Zytoimmunologisches Monitoring	30
2.1.1	Gewinnung der Zellen	30
2.1.2	Bearbeitung des Blutes	30
2.1.2.1	Leukozyten	30
2.1.2.2	Differentialblutbild	30
2.1.2.3	Herstellung des mononukleären Kon- zentrates	30
2.1.3	Bearbeitung der mononukleären Sus- pension	31
2.1.3.1	Erstellung der Präparate	31
2.1.3.2	Markierung der Zellen mit Antikörpern	32
2.1.4	Färbung nach Pappenheim	34
2.1.5	Differenzierung der Zellen	35
2.1.5.1	Mikroskopische Grundlagen	35
2.1.5.2	Differenzierung der Präparate	35
2.1.6	Auswertung der Immunfluoreszenz	38
2.1.7	Quantitative Auswertung	40
2.1.7.1	Subpopulationen der Leukozyten	40
2.1.7.2	Subpopulationen der Lymphozyten	40

2.1.7.3	Verhältnis IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen	40
2.2	Histologische Grundlagen	40
2.2.1	Die Endomyokardbiopsie	40
2.2.2	Die Autopsie	42
2.3	Messung des Herzgewichtes	42
2.4	Statistik	43
3.	Ergebnisse	46
3.1	Immunologische Ergebnisse	46
3.1.1	Die zelluläre Abstoßung	46
3.1.2	Einfluß der Methylprednisolontherapie während zellulärer Abstoßung	47
3.1.3	Die bakterielle Infektion	50
3.1.4	Einfluß der Antibiotikatherapie auf die bakterielle Infektion	51
3.1.5	Die virale Infektion	54
3.1.6	Der therapeutische Einfluß auf die virale Infektion	54
3.1.7	Die zelluläre Abstoßung im Verlauf einer bakteriellen Infektion	55
3.1.8	Einfluß der Therapie auf bakterielle Infektion und zelluläre Abstoßung	58
3.1.9	Die zelluläre Abstoßung im Verlauf einer viralen Infektion	61
3.1.10	Einfluß der Therapie auf virale Infektion und zelluläre Abstoßung	62
3.1.11	Die humorale Abstoßung	65
3.1.12	Einfluß der Methylprednisolontherapie nach humoraler Abstoßung	65
3.2	Veränderungen des Herzgewichtes nach Abstoßung	69
3.3	Postoperative Überwachung mit und ohne Endomyokardbiopsie	70

3.4	Vergleich zwischen zytoimmunologischem Monitoring und Endomyokardbiopsie	72
Teil C - Diskussion		74
1.	Historischer Überblick	76
2.	Diskussion der eigenen Ergebnisse	78
2.1	Die Versuchstiere	78
2.2	Die Medikamente	79
2.3	Überlebenszeit	80
2.4	Die Transplantatabstoßung	82
3.	Schlußfolgerungen	86
4.	Ausblick	87
5.	Zytoimmunologisches Monitoring - historischer Überblick	88
6.	Diskussion des zytoimmunologischen Monitorings	90
6.1	Durchführung des zytoimmunologischen Monitorings	91
6.1.1	Untersuchungsmaterial	91
6.1.2	Zeitaufwand und Fehlerquellen	92
6.1.3	Anwendungsbereich	93
6.2	Differentialdiagnose Abstoßung - Infektion	93
6.3	Die Wertigkeit des zytoimmunologischen Monitorings	97
6.4	Nachteile des zytoimmunologischen Monitorings	98
7.	Ausblick	99
Literatur		100
Zusammenfassung		125
Worte des Dankes		127

EINFÜHRUNG

Die Herztransplantation wird in den letzten Jahren zur Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz (156) angewandt. Trotz der großen Fortschritte im klinischen und immunologischen Bereich blieben zahlreiche Fragen bisher ungelöst.

Der Inhalt dieser Arbeit setzt sich aus zwei Themen zusammen, 1. einem klinisch-histologischen und 2. einem immunologischen Thema. Beide lassen sich unter dem Überbegriff Herztransplantation zusammenfassen:

Teil A: Xenogene Herztransplantation unter Immunsuppression mit Ciclosporin im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung.

Teil B: Cytoimmunologisches Monitoring nach allogener und xenogener Herztransplantation.

Die beiden Teilbereiche werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Thematik getrennt behandelt. In der Diskussion (Teil C) wird versucht, einen Zusammenhang zwischen beiden Problemen zu erzielen.

Teil A:

1. EINLEITUNG

Durch verbesserte operative Verfahren, Konservierungslösungen, immunsuppressive Therapeutika und intensivmedizinische Möglichkeiten konnten in den vergangenen Jahren große Erfolge auf dem Gebiet der Organtransplantation erzielt werden. Vor allem die Chance auf eine "Restitutio ad integrum" steigerte in den letzten Jahren die Zahl der Operationen und somit auch den Bedarf an geeigneten Spendern. Auf Grund der sehr strengen Spenderkriterien (54, 140) sind auf dem Gebiet der Herztransplantation nach wie vor Engpässe zu verzeichnen.

Dieser Mangel an geeigneten Spenderorganen ließ die Transplantationsforschung nach Möglichkeiten suchen, die vorübergehend oder auf Dauer als Ersatz für ein menschliches Herz in Frage kämen. Dazu bieten sich zwei heute noch sehr schwierige Wege an:

1. Die Verwendung artfremder Organe
2. Die Verwendung künstlicher Organe (120)

Die Geschichte der xenogenen Transplantation geht bis auf das Jahr 1905 zurück (167). Die kurzen Überlebenszeiten der transplantierten artfremden Organe (109, 191) dämpften den Optimismus, bis Anfang der 60er Jahre die xenogene Transplantation erneut Anstoß erhielt (1, 80, 96, 101, 152). Die Erfolge der Gruppe um Reemtsma (170, 171, 172) und Starzl (184) blieben unter Berücksichtigung der damaligen immunologischen Kenntnisse beachtlich. So überlebte ein Patient mit einer Pavianniere neun Monate (184).

Parallel zur Verpflanzung von xenogenen Organen auf Menschen wurden speziell auf dem Gebiet der Herztransplantation Versuche mit künstlichen Blutpumpen unternommen, die nicht den gewünschten Erfolg erbrachten.

Diese Arbeit konzentriert sich auf das Problem der xenogenen Herztransplantation. Mit Hilfe eines Tiermodells sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann Ciclosporin in der Herztransplantation eng verwandter Spezies erfolgreich verwendet werden?
2. Welche Typen von Transplantatreaktion treten nach xenogener Herztransplantation eng verwandter Spezies auf?
3. Welche Subpopulationen der Leukozyten sind daran beteiligt?
4. Ist der klinische Einsatz einer xenogenen Herztransplantation denkbar?

2. GRUNDLAGEN XENOGENER ORGANTRANSPLANTATION UND TRANSPLANTATREAKTION

2.1 Grundlagen der xenogenen Transplantation

Unter xenogener Transplantation versteht man die Übertragung von Geweben oder Organen zwischen Individuen, die verschiedenen Spezies angehören (17, 115). Wurden anfänglich unter dem Begriff der xenogenen Transplantation sämtliche Spender-Empfänger-Kombinationen subsummiert, erkannte man bald die Ungenauigkeit dieser Definition. Aus diesem Grund erfolgte eine Unterteilung in Spender-Empfänger-Kombinationen. Hierbei werden drei Klassen entsprechend ihrem Verwandtschaftsgrad unterschieden: Die xenogene Transplantation 1. innerhalb zoologischer Familien, aber zwischen verschiedenen Tierspezies, sogenannte "Cross-Species-Transplantationen", 2. innerhalb einer Ordnung, aber zwischen verschiedenen Mitgliedern einer zoologischen Familie (Cross-Family-Transplantation) und 3. unter verschiedenen Säugetierordnungen (Cross-Order-Transplantation) (32).

In den bisher durchgeführten Studien (45, 90, 154, 171) wurde bewiesen, daß die Überlebenszeit xenogener Transplantate wesentlich vom Grad der zoologischen (nicht genetischen im Sinne der Histokompatibilitätstestung) Verwandtschaft abhängt (43). Je weiter der Spender in der zoologischen Systematik von dem Empfänger entfernt ist, desto kürzer sind die Überlebenszeiten. Bei Cross-Order-Transplantationen wie z.B. Kaninchen und Hund (134), Schaf und Hund (94) oder Schwein und Hund (92, 126, 131, 141, 149, 165, 178, 182) betrugen die Funktionszeiten der transplantierten Organe nur wenige Minuten. Bei Cross-Family-Transplantationen wie z.B. Katze-Hund (44, 152) oder Meerschweinchen-Kaninchen (155) konnten Überlebenszeiten der transplantierten Organe von mehreren Stunden erzielt werden, während bei Cross-Spezies-Transplantationen unter immunsuppressiver Therapie Überlebenszeiten von Monaten verzeichnet wurden (101, 164, 172, 184).

2.2 Die Bedeutung präformierter natürlicher Antikörper bei der xenogenen Abstoßungsreaktion.

Die hyperakute oder verzögert hyperakute Abstoßungsreaktion, wie sie regelmäßig nach Cross-Order- bzw. Cross-Family-Transplantationen auftritt (127, 142), ist auf die Beteiligung sogenannter präformierter, natürlicher Antikörper zurückzuführen (143). Diese Antikörper kommen bei allen Säugetieren gegen Erythrozyten, Leukozyten und Gewebe anderer Spezies vor und werden von jedem höheren Organismus nach dem intrauterinen Leben gebildet (94). Sie gehören vorwiegend den Immunglobulinen der IgM-Klasse an (105). Die Titer der präformierten natürlichen Antikörper nehmen mit geringer werdender zoologischer Disparität ab. Verschiedene Spezies einer zoologischen Familie haben keine meßbaren Titer dieser Antikörper (92, 165).

2.3 Xenogene Organtransplantation innerhalb einer zoologischen Familie

Innerhalb der Spender-Empfänger-Kombination einer Familie, wie z.B. der Caniden (Hundeartigen), kann eine weitere Einteilung in nah verwandte und entfernt verwandte Spezies getroffen werden. Verwendete man den Hund als Universalempfänger für Organe verschiedener Spezies aus der Familie der Caniden wie Dingo, Wolf und Fuchs, überlebten Nieren- bzw. Hauttransplantate von Dingo und Wolf ähnlich lange oder länger als allogene Transplantate bzw. signifikant länger als entsprechende Transplantate vom Fuchs (45, 68, 90).

Aufgrund dieser erfolgversprechenden Ergebnisse wurden Versuche zur Wirksamkeit einer immunsuppressiven Therapie in xenogenen experimentellen Transplantationssystemen, vorwiegend im System Fuchs-Hund, durchgeführt. Die Behandlung mit Antilymphozytenglobulin (ALG) oder mit ALG und Cortison verlängerte signifikant die Überlebenszeit von Fuchsnierentransplantaten auf Beagles (91). Studien über den Verwandtschaftsgrad von Hund, Dingo, Wolf und Fuchs (89, 90) ergaben, daß sowohl Dingo als auch Wolf mit dem Hund in wichtigen Merkmalen wie Erythrozyten- (90) und Leukozytenantigenen (90) übereinstimmen. Deshalb sollten diese beiden Systeme als semi-xenogen bezeichnet werden. Fuchs und Hund dage-

gen unterscheiden sich in wichtigen Merkmalen (90) und sind entsprechend der bisherigen Lehrmeinung als xenogenes Spender-Empfänger-System aufzufassen (45). Da dieses System somit nah verwandt ist (keine präformierten Antikörper) (90) und längere Transplantat-Überlebenszeiten möglich sind, bot sich diese Kombination für eine klinisch-histologische Fragestellung nach xenogener Herztransplantation an.

2.4 Genetische Unterschiede zwischen Fuchs und Hund

2.4.1 Gewebetypsierung

Mit Hilfe von Hunde-Allo-Antiseren konnten zwölf DL-A-Spezifitäten bei Hunden erkannt werden. Diese DLA-Haplotypen liegen auf zwei Allelen des Chromosoms mit dem gesamten "major histocompatibility complex". Bei Füchsen konnten nur solche Allo-Antiseren von Hunden, die aus Langzeit-Immunisierungsversuchen stammten und ein relativ breites Antikörpermuster trugen, einen Polymorphismus der DLA- (FLA-) Antigene nachweisen. Ein voller Haplotyp konnte mit diesen Seren nie gezeigt werden (90).

2.4.2 Erythrozytenantigene

Im Gegensatz zu Hunden, wo mit Alloantiseren acht Erythrozytenantigene bestimmt werden konnten, wurden bei Füchsen mit den selben Seren nur zwei gefunden. Dies würde bedeuten, daß der Fuchs eine gewisse Identität mit dem Hund aufweist.

2.4.3 Isoenzymmuster

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Adenylkinase, 6-Phosphoglucohydrogenase und Adenosindeaminase von Fuchs und Hund war gleich. Nur die Phosphoglucomutase des Fuchses bewegt sich im elektrischen Feld deutlich getrennt von der des Hundes (90).

2.4.4 Immunelektrophorese

Die Serumproteine von Fuchs und Hund unterscheiden sich in der Wanderungsgeschwindigkeit und im Molekulargewicht von Albumin und γ -Globulin (90).

2.4.5 Chromosomenanalyse

Der Hund besitzt 78 Chromosomen ($2n$). Charakteristisch ist, daß alle Autosomen terminal gelegene Zentromere besitzen. Das X-Chromosom, eines der größten im Satz, ist ähnlich wie das Y-Chromosom mit einem submedialen Zentromer ausgestattet (90).

Die Chromosomenzahl der Füchse variiert stärker als die der Hunde. Der diploide Chromosomensatz bewegt sich zwischen $2n = 34$ und $2n = 40$, mit meist $n = 38$ Chromosomen. Der Karyotyp wird durch eine Gruppe von 16 Chromosomen charakterisiert, die ein medial bis submedial bzw. subterminal gelegenes Zentromer besitzen (Abb. 1).

2.5 Grundlagen der Transplantatreaktion

2.5.1 Die zelluläre Abstoßungsreaktion

2.5.1.1 Immunologie

Die Abstoßungsreaktion von Allotransplantaten gehört in den Formenkreis der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ. Sie läuft über zellvermittelte Immunreaktionen ab (14, 77). Studien (16) zeigten, daß T-Lymphozyten bei der Früherkennung des Herztransplantates eine entscheidende Rolle spielen und maßgeblich an der akuten Transplantatabstoßung beteiligt sind. Aber auch B-Lymphozyten konnten im Transplantat nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bewiesen die Beteiligung von Makrophagen an der Abstoßung (16).

2.5.1.2 Histologie

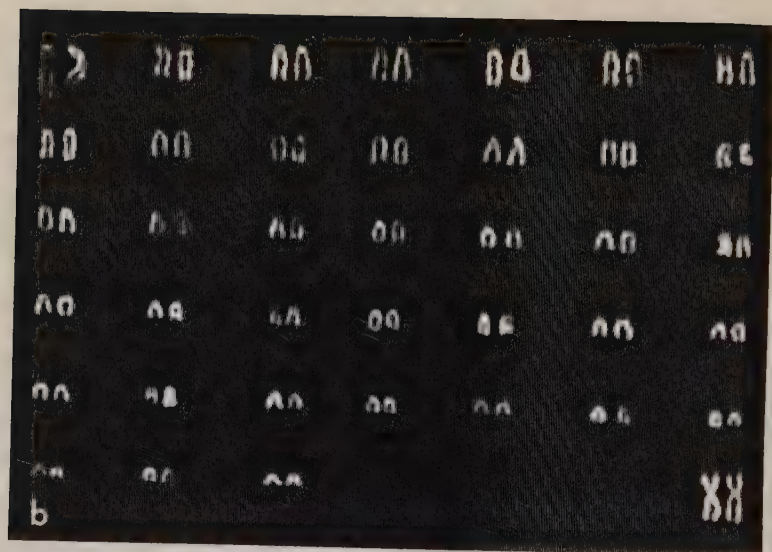
Nach Caves und Billingham erfolgt die histologische Einteilung der akuten zellulären Transplantatabstoßung in vier Schweregrade (12, 13, 36)

1. Frühe Abstoßung (reversibel):

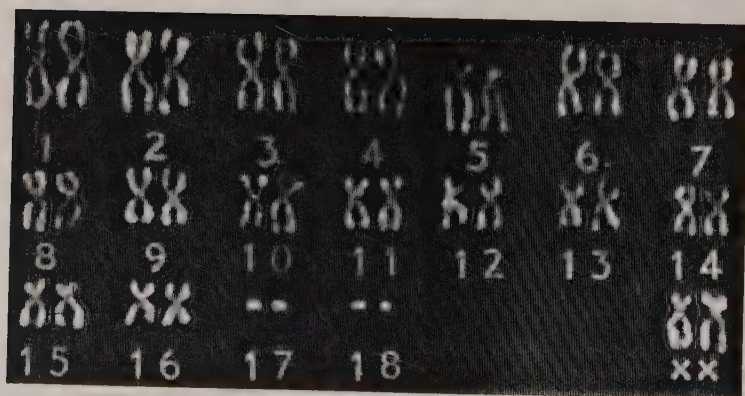
Endokardiales und interstitielles Ödem. Wenige perivaskuläre und endokardiale Infiltrate von mononukleären Zellen.

2. Mäßige Abstoßung (reversibel):

Zunehmende interstitielle, perivaskuläre und endokardiale Infiltrationen von mononukleären Zellen. Fokale Myozytende-



A



B

Abb. 1

Karyogramme eines Hundes ($2n=78$, A) und eines Fuchses ($2n=38$, B)

generationen und Nekrosen.

3. Schwere Abstoßung (oft irreversibel):

Interstitielle Infiltrationen mit mononukleären Zellen und neutrophilen Granulozyten. Interstitielle Hämorrhagien mit Gefäßwandnekrosen und wachsender Myozytennekrose (Abb.2).

4. Abklingende Abstoßung:

Aktive Fibroblasten und Fibrose bzw. regrediente Zellinfiltrationen.

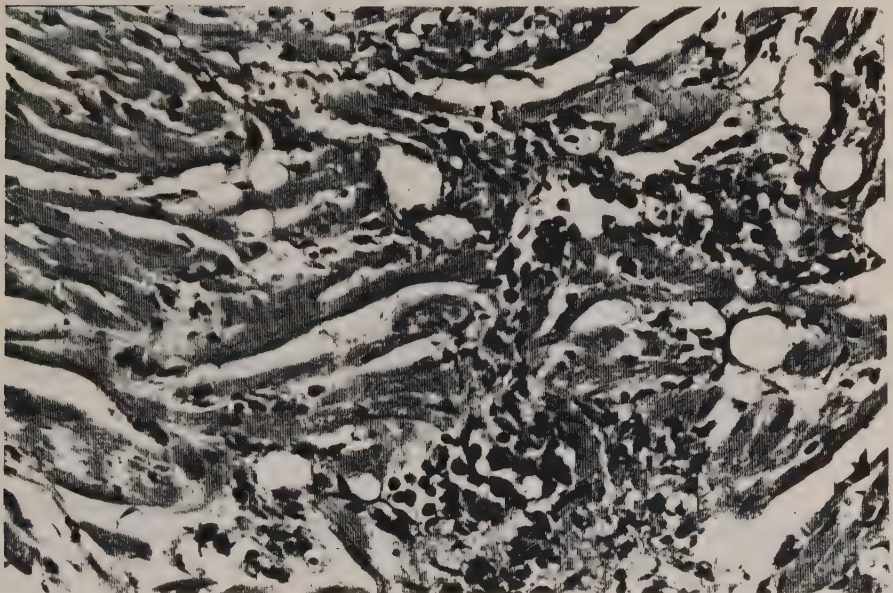


Abb. 2

Schwere Abstoßungsreaktion mit interstitiellen Zellinfiltraten und Myozytennekrosen. Pbs. HF. Haren. 600x

2.5.2 Die humorale Abstoßung.

2.5.2.1 Immunologie:

Der Auslösemechanismus einer humoralen Abstoßung bzw. deren exakter Verlauf ist bis heute nicht geklärt. Sicher ist die Beteiligung von Antikörpern, die mit Hilfe von Komplement eine Lyse von transplantierten Zellen verursachen (150). Des weiteren wird eine Gefäßreaktion im Sinne einer Konstriktion und Änderungen des Gerinnungssystem diskutiert.

2.5.2.2 Histologie:

Histopathologische Untersuchungen xenogener Herztransplantate zeigten bei vielen Arbeitsgruppen (64, 79, 113, 150) übereinstimmende Ergebnisse. Es konnte ein diskretes interstitielles Ödem sowie ausgeprägte Hämorrhogien des Myokards beobachtet werden. Die Lumina kleiner Gefäße und die Kapillaren waren mit Hyalinthromben (weiße Thromben = aggregierte Thrombozyten) verschlossen. Teilweise waren auch größere Gefäße thrombosiert. In den Gefäßwänden fanden sich vereinzelt fibrinoide Nekrosen. Die Mehrzahl der oben zitierten Autoren fand ein mildes polymorphkerniges Infiltrat, in der Regel aber keine Lymphozyten. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik konnte an den Gefäßwänden kleiner Blutgefäße und am Sarkolemm des Myokards Immunglobulin G nachgewiesen werden.

Diese Veränderungen unterscheiden sich grundlegend von denjenigen während einer zellulären Transplantatreaktion und erlauben eine histologische Differenzierung zwischen humoraler und zellulärer Abstoßung.

3. MATERIAL UND METHODEN

Als Operationstechnik der Wahl wurde die heterotope intrathorakale Herztransplantation nach Jamieson et al. (110) gewählt. Die Komplikationsrate ist gering, da auf Herzlungenmaschine und Antikoagulation des Empfängertieres verzichtet werden kann. Gegenüber der intraabdominellen heterotopen Herztransplantation werden Komplikationen wie Invagination oder Peritonitis vermieden (110). Es wurden allogene und xenogene heterotope Herztransplantationen durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Als Empfänger dienten in der allogenen Gruppe (Gruppe A: n = 7) wie in der xenogenen Gruppe (Gruppe X: n = 8) Mischlingshunde mit einem durchschnittlichen Gewicht von $18,5 + 3,15$ kg bzw. $18,1 + 4,5$ kg.

Als Spender wurden in der allogenen Gruppe Mischlingshunde, in der xenogenen Gruppe europäische Rotfüchse verwendet.

Die Prämedikation erfolgte mit N-(3'-dimethyl-aminopropyl)-3-propionyl-phenothiazin-phosphat¹⁾ ($0,4$ mg/kg Körpergewicht) und Levomethadonhydrochlorid²⁾ ($0,75$ mg/kg Körpergewicht) intramuskulär. Die Versuchstiere wurden daraufhin relaxiert, endotracheal intubiert und maschinell³⁾ beatmet. Die Fortführung der Narkose⁴⁾ erfolgte mit einem Sauerstoffstickoxid-Gemisch und Halothan ($0,6-1,5\%$)

3.2. Operative Technik

3.2.1 Spender

Der Brustkorb des Spenders wird mittels einer medialen Thorakotomie eröffnet. Obere und untere Hohlvene sowie beide Trunci bra-

1) Rompun 2 %ige Lösung, Fa. Bayer, Leverkusen

2) Ketanest, Fa. Parke, Davis & Company, 8000 München 2

3) Engström respirator system 300, LKB Medical AB, Schweden

4) Halotan, Fa. Hoechst AG, Frankfurt

chiocephalici werden umschlungen. Die Vena azygos wird ligiert und durchtrennt. Der Perikardbeutel wird eröffnet und bis zu den Lungenvenen in toto reseziert. Die Aorta descendens wird distal des Ligamentum Botalli mit einem Haltebändchen umschlungen (Abb. 3).

Zur Entnahme des Herzens wird das Spendertier mit 375 IE/kg Körpergewicht Heparin¹⁾ antikoaguliert.

Der rechte Truncus brachiocephalicus wird distal ligiert und zum Zweck der Koronarperfusion mit einem dicken Plastikschauch²⁾ kanüliert. Anschließend wird der Truncus brachiocephalicus sinister sowie obere und untere Hohlvene ligiert. Das Herz schlägt somit leer. Der Blutstrom in der Aorta descendens wird mittels Aortenklemme unterbrochen³⁾ und das Herz mit kardioplegischer Lösung nach Bretschneider³⁾ (27)^o perfundiert. Zusätzlich⁴⁾ wird das Spenderherz von außen mit 4^o C kalter Kochsalzlösung umspült, um eine optimale Myokardprotektion sicherzustellen.

Der Herzstillstand erfolgt in der Regel nach 10 - 15 Sekunden Perfusionszeit. Verwendet wird 20 ml/kg Körpergewicht kardioplegische Lösung mit einer Perfusionszeit von ungefähr 5 - 6 Minuten. Nach Beendigung der Perfusion werden beide Hohlvenen, die Arteria pulmonalis sowie die Aorta descendens durchtrennt. Die Lungenvenen werden ligiert und ebenfalls durchtrennt. Das Spenderherz kann entnommen werden (Abb. 4)⁴⁾ und wird bis zur Implantation in 4^o C kalter Kochsalzlösung gelagert.

Abweichend von der Technik nach Jamieson (110) wurde kein künstlicher Vorhofseptumdefekt angelegt.

1) Heparin-Natrium 25000 medac, Fa. Medac GmbH, 2 Hamburg 36

2) Intrafix Air-Infusionssystem, Fa. Braun Melsungen AG

3) Kardioplegische Lösung-HTK nach Bretschneider, Fa. Franz Köhler Chemie, Alsbach, Bergstraße

4) Irribiol 1000ml (Spüllösung), Dubernard Hospital GmbH



Abb.3

Darstellung des Spendersitus nach Umschlingen aller großen Gefäße (a=Aorta ascendens, bs=Truncus brachiocephalicus sinister, bd=Truncus brachiocephalicus dexter, cs=Vena cava superior, ci=Vena cava inferior)



Abb.4

Spenderherz nach Explantation; Darstellung von Aorta ascendens (a), Arteria pulmonalis (p) und linkem Vorhof mit den ligierten Lungenvenen (v)

3.2.2 Empfänger

Parallel hierzu erfolgt die Präparation des Empfängers. Der Brustkorb wird in Höhe des dritten Interkostalraumes lateral eröffnet (Abb. 5) und der linke Truncus brachiocephalicus unter Schonung des Nervus vagus sinister dargestellt. Über das vordere Mediastinum wird die Vena cava superior distal des Perikardes freigelegt, das dabei verschlossen bleibt. Der Nervus phrenicus sinister darf hierbei nicht verletzt werden (Abb. 5, 6). Beide Gefäße werden von der Adventitia befreit und mit Haltebändchen umschlungen.

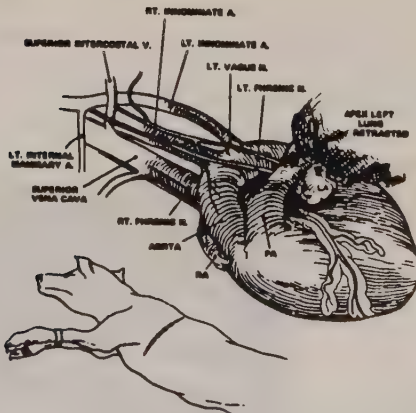


Abb. 5

Schematische Darstellung des Empfängersitus; die gestrichelten Linien sind mit den Inzisionen zur Anastomosierung gleichzusetzen (aus: A new method for heterotopic cardiac transplantation in the dog, Jamieson S.W., J.Surg.Res., Vol 32, 150, 1982)

Zum Zweck der Implantation wird die Vena cava superior partiell mit Hilfe einer Sadinsky-Klemme ausgeklemmt. Nach Anlegen einer Längsinzision wird die Arteria pulmonalis des Spenderherzens End zu Seit mit der Vena cava superior anastomosiert (Abb. 7).

Nach Anlegen der ersten Anastomose wird mit Hilfe einer zweiten Sadinsky-Klemme der Truncus brachiocephalicus sinister ausgeklemmt, längsinzidiert und mit der Aorta des Spenderherzens End zu Seit anastomosiert (Abb. 7).

Als Nahtmaterial wurde monofiles Polymopylene der Stärke 4.0¹⁾ verwendet, die Nahttechnik war fortlaufend.

Sind beide Anastomosen beendet, werden die Sadinsky-Klemmen entfernt. Bei guter Konservierung defibrillieren sich die transplantierten Herzen zumeist spontan; in einigen wenigen Fällen mußte der Defibrillator Hilfestellung leisten.

Das transplantierte Herz kommt auf dem Herz des Empfängers zu liegen und läßt durch seine Lage die Belüftung des linken Oberlappens unbeeinflußt (Abb. 8, 9)

Nach erfolgreich beendeter Transplantation wird der Thorax mit Einzelnähten aus resorbierbarem Nahtmaterial²⁾ verschlossen. Eine Drainage zur Beseitigung des Pneumothorax wird nach Erwachen des Versuchstieres aus der Narkose entfernt. Die Hunde tolerierten die laterale Thorakotomie gut und konnten zumeist am Abend bereits trinken.

1) Prolene 4.0, Fa. Ethicon

2) Vicryl 2.0, 3.0, Fa. Ethicon



Abb. 6

Darstellung der großen Gefäße und Nerven in situ. Vena cava superior (vs) und Truncus brachiocephalicus (bs) sind mit Haltebändchen umschlungen (np=nervus phrenicus)

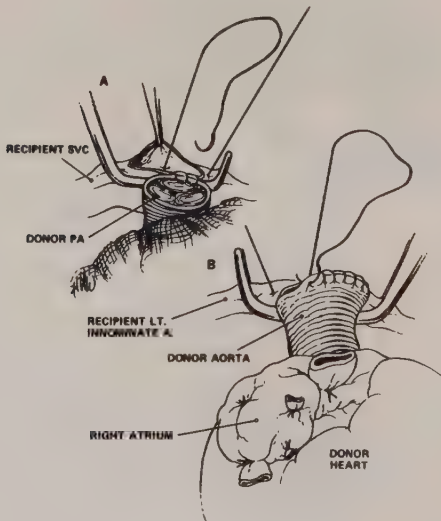


Abb. 7

Schematische Darstellung beider Anastomosen
(aus: A new method for heterotopic cardiac transplantation in the dog, Jamieson S.W., J.Surg.Res., Vol. 32, 150, 1982)

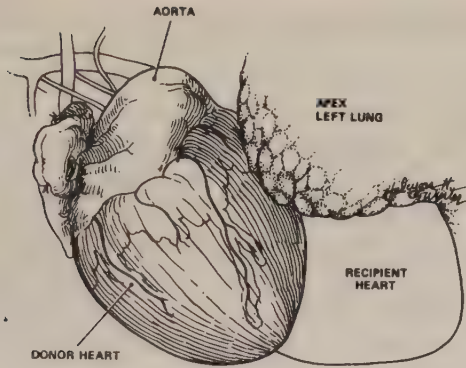


Abb.8

Schematische Darstellung des transplantierten Herzens, das durch seine Lage weder die Funktion der Lunge noch des Herzens des Empfängers beeinflusst

(aus: Jamieson S.W., J.Surg.Res., Vol. 32, 150, 1982)



Abb.9

Die Position des transplantierten Herzens in der linken oberen Thoraxhälfte des Empfängers in situ (vgl. Abb.8)

(np=nervus phrenicus, nv=nervus vagus sinister, aa=aortale Anastomose)

3.3. Immunsuppressive Therapie

Als immunsuppressive Therapeutika wurden Ciclosporin¹⁾ und Prednison²⁾ verwandt.

3.3.1 Ciclosporin

Der Pilzmetabolit Ciclosporin ist ein kleines zyklisches Polypeptid (elf Aminosäuren), dessen immunsuppressive Wirkung 1976 von Borel et al. entdeckt wurde (18, 20, 21). Seine Erprobung fand in Tierexperimenten mit verschiedenen Versuchstieren (Ratte, Hund, Schwein, Kaninchen, Affe) (145) und der Transplantation verschiedenster Organe (Niere, Herz, Leber, Haut) statt (33). Seit 1981 wird es auch in der klinischen Herztransplantation angewendet (158).

Die Hauptwirkung von Ciclosporin beruht auf einer Hemmung der Freigabe von Interleukin 1 und 2 und somit einer gestörten Proliferation der T-Lymphozyten (28). Außerdem soll Ciclosporin die humorale Immunität durch eine Verminderung der plaquebildenden Zellen und deren Hämagglutinine einschränken, wobei die Meinung hierüber in der Literatur geteilt ist (19, 107, 194). Nebenwirkungen, die beim Menschen bereits unter therapeutischen Dosen auftraten (17), konnten bei Versuchstieren nicht beobachtet werden (145).

3.3.2 Cortikosteroide

In dieser Studie wurden die beiden synthetisch hergestellten Kortikoide Prednison und Methylprednisolon verwendet. Beide Präparate besitzen neben dem inflammatorischen vor allem einen stark immunsuppressiven Effekt (76). Angriffspunkte der Kortikoide an den Lymphozyten sind Cytoplasmarezeptoren sowie das Cyclo-AMP, welche über Strukturalteration die Enzymsynthese beeinflussen. Hauptnebenwirkung ist eine verminderte körpereigene Abwehr und somit ein erhöhtes Infektionsrisiko (76).

1) Sandimmun, Fa. Sandoz AG, 8500 Nürnberg

2) Solu-Decortin-H, Fa. E. Merck, Darmstadt

3.3.3 Dosierung

Die Dosierung der immunsuppressiven Therapie erfolgte nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema (Tab. 1).

Die Basistherapie bestand aus einer Kombination von Ciclosporin und Prednison in niedriger Dosierung entsprechend dem Standardschema (157). Akute Transplantatabstoßungen wurden mit 250 mg Methylprednisolon¹⁾ über 3 - 5 Tage behandelt, wobei der Erfolg der Therapie mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings kontrolliert wurde.

Zusätzlich erhielten alle Versuchstiere Acetylsalicylsäure²⁾ in einer Dosierung von 2 x 0,5 g pro Tag zur Hemmung der Thrombozytenaggregation (180).

Medikament	prä-OP		post-OP		akute Abstoßung
	Zeit	Dosis	Zeit	Dosis	
Cyclosporin A (mg/kg/Tag) oral	4 h prä-OP	18	ab Tag 1	8-16 ¹⁾	keine Dosis- änderung
Prednison (mg/kg/Tag) oral	- -	- -	Tag 1 - 7 Tag 7 - 14 ab Tag 15	1,0 0,5 0,25	keine Dosis- änderung
Methylpredni- solon (mg i.v.)	250 nach Reperfusion des Spenderherzens		- -	- -	3 - 5 x 250 ²⁾

Tab.1

Prä- und postoperatives Therapieschema

1) Urbason solubile, Fa. Hoechst AG, Frankfurt

2) Aspirin, Fa. Bayer, Leverkusen

3.4 Postoperative Überwachung

Die Funktion des transplantierten Herzens wurde dreimal pro Woche mit Hilfe eines EKG-Gerätes kontrolliert (Abb. 10).

Parallel hierzu wurde dreimal pro Woche das zytoimmunologische Monitoring durchgeführt.

Traten klinische Zeichen einer Infektion wie gesteigerte Produktion von Bronchialsekret, Husten oder Fieber auf, wurden den Versuchstieren Abstriche und Blutkulturen entnommen. Bei positivem bakteriellern Befund fand eine Resistenzbestimmung (Antibiogramm) statt.

Die Diagnose der viralen Infektion wurde durch Ausschluß einer Infektion mit Bakterien oder Protozeen gestellt.

Bakterielle Infektionen wurden entsprechend Antibiogramm mit Antibiotika behandelt, virale Infektionen symptomatisch mit Infusionen und Immunglobulinen.

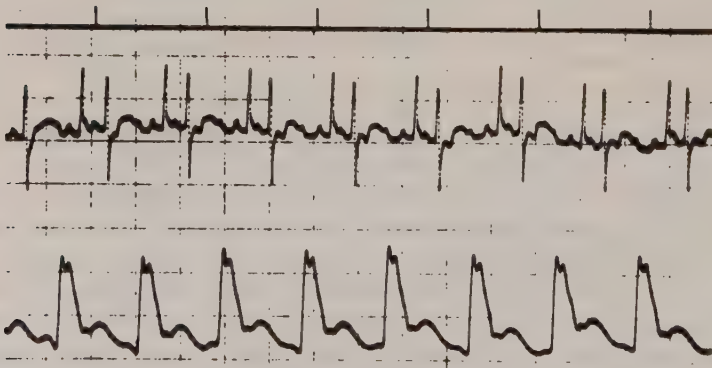


Abb. 10

Elektrokardiogramm des Empfängertieres im Vergleich mit der femoroarteriellen Druckkurve. Darstellung des QRS-Komplexes von Empfänger- und Spenderherz

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der allogenen und xenogenen heterotopen Herztransplantation

In dieser Studie wurden 8 allogene und 10 xenogene heterotop Herztransplantationen durchgeführt. Die operative Sterblichkeit lag bei 17 %. Ursache hierfür waren nicht zu beherrschende Blutungen an der aortalen Anastomose.

Von den 15 erfolgreich transplantierten Versuchstieren erhielten sieben Hunde ein allogenes Herztransplantat (Gruppe A; n = 7), acht Hunde ein xenogenes (Gruppe X, n = 8). Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere in Gruppe A lag bei $18,5 \pm 1,19$ kg, das der Gruppe X bei $19,1 \pm 1,59$ kg.

Die durchschnittliche Ischämiezeit des transplantierten Herzens betrug in Gruppe A $82,1 \pm 8,2$ min; in Gruppe X $67,2 \pm 3,57$ min (kein signifikanter Unterschied).

Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug in Gruppe A $92,9 \pm 54,0$ Tage, in Gruppe X $18,0 \pm 3,3$ Tage (Tab. 2). Ein signifikanter Unterschied bestand auf Grund der hohen Standardabweichungen nicht.

Die Todesursachen der Versuchstiere sind in Tab. 3 festgehalten. Zwei Tiere (A 2, A 3) starben an generalisierter Toxoplasmose (Abb. 11), ein Tier (X 2) an bakterieller Sepsis, zwei Tiere (A 6, A 7) an viraler Sepsis und ein Tier (X 3) an einer Peritonitis auf Grund einer Invagination des Dickdarmes.

Bei Kammerflimmern oder Asystolie des transplantierten Herzens wurde das Versuchstier sofort eingeschläfert und einer Autopsie unterzogen. Die transplantierten Herzen von zwei Versuchstieren (X 1, X 5) wiesen das typische histologische Bild einer humoralen Abstoßung auf, zwei Versuchstiere (A 1, X 4) das Bild einer zellulären Transplantatreaktion und drei Versuchstiere (X 6, X 7, X 8) sowohl humoral als auch zellulär bedingte Myokardveränderungen.

Versuchstiere	Überlebenszeit (Tage)
Gruppe A (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7)	92,9 ± 54,0
Gruppe X (X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8)	18,0 ± 3,3

Tab. 2

Durchschnittliche Überlebenszeit der allogenen (Gruppe A, n=7) bzw. xenogenen (Gruppe X, n=8) transplantierten Versuchstiere

Gruppe	Nr.	Überlebenszeit (Tage)	Todesursache
Gruppe A (allogen)	A1	36	eingeschläfert *
	A2	39	Toxoplasmosesepsis
	A3	30	Toxoplasmosesepsis
	A4	408	eingeschläfert **
	A5	112	eingeschläfert **
	A6	10	Viruspneumonie
	A7	15	Viruspneumonie
Gruppe X (xenogen)	X1	16	eingeschläfert *
	X2	33	Bronchopneumonie
	X3	9	Invagination
	X4	10	eingeschläfert *
	X5	10	eingeschläfert *
	X6	17	eingeschläfert *
	X7	31	eingeschläfert *
	X8	16	eingeschläfert *

Tab. 3

Überlebenszeit bzw. Todesursache aller Versuchstiere

*bei Asystolie oder Kammerflimmern des transplantierten Herzens (Nachweis im EKG) wurde das jeweilige Versuchstier sofort eingeschläfert.

**Bei beiden Versuchstieren wurde nach 400 bzw. 100 Tagen die immunsuppressive Therapie abgesetzt, um die Toleranzentwicklung nach Ciclosporin zu untersuchen

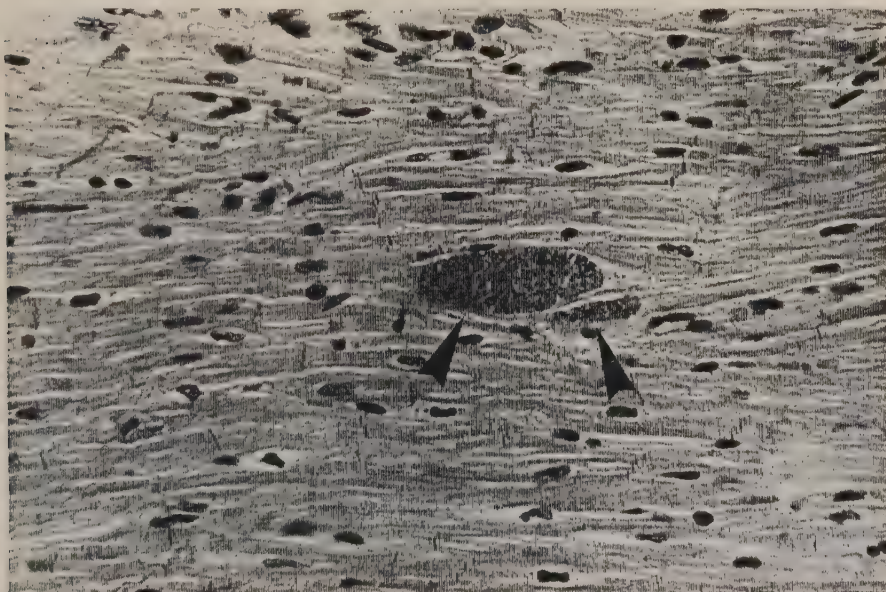


Abb. 11

Schnitt durch das Myokard eines Empfängerherzens; das Versuchstier starb am 39. postoperativen Tag an einer Toxoplasmosesepsis. Deutlich sichtbar sind die für die Toxoplasmose typischen Granulome (Pfeile); Fbg. HE, Vergr. 600x

Die Versuchstiere A 4 und A 5 erreichten mit 408 bzw. 112 Tagen die längsten Überlebenszeiten. An diesen beiden Tieren wurde nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie die Entwicklung einer Toleranz gegenüber dem Transplantat untersucht. Die transplantierten Herzen beider Tiere wurden am 18. Tag (A 4) bzw. 13. Tag (A 5) nach Absetzen der Therapie abgestoßen. Eine Toleranzentwicklung konnte somit nicht beobachtet werden, wohl aber eine verzögert auftretende Abstoßungsreaktion.

Zusammenfassung

Die Überlebenszeit allogener Herztransplantate unterscheidet sich wesentlich von den xenogenen Transplantaten. Die Abstoßung letzterer war meist therapieresistent.

Eine Toleranzentwicklung nach Ciclosporin-Therapie konnte nicht beobachtet werden.

4.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchung von allogenen und xenogenen Herztransplantaten

4.2.1 Allogene Transplantate

Die in Endomyokardbiopsie und Autopsie vorgefundenen Veränderungen des Endo-, Myo- und Epikards während Abstoßung entsprechen den Veränderungen, wie sie in Kapitel 2.5.1.2 beschrieben sind. Anzeichen einer humoralen Abstoßung nach allogener Herztransplantation konnten nicht festgestellt werden.

4.2.2 Xenogene Transplantate

Tabelle 4 beschreibt die morphologischen Veränderungen, die in den Biopsien und Autopsien xenogener Hertransplantate diagnostiziert werden konnten.

Die Versuchstiere X 1, X 5, X 6, X 7, X 8 zeigten pathologische Veränderungen im Sinne von Hämorrhagien und vor allem fibrinoiden Nekrosen (Abb.12). Diese Veränderungen treten wie in Kapitel 2.5.2.2 beschrieben nur bei humoraler Abstoßung auf. Drei dieser Tiere (X 6, X 7, X 8) hatten einige zellreiche Infiltrate im Endokard und perivaskulären Bindegewebe. Dies deutet auf eine Beteiligung des zellulären Teiles des Immunsystems hin.

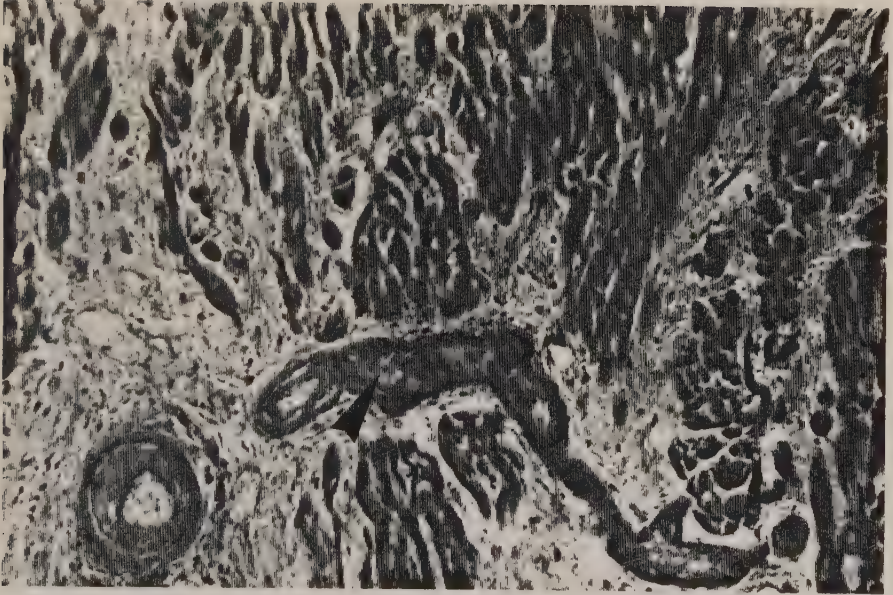


Abb. 12

Humorale Abstoßungsreaktion, die zum Verlust des Transplantates führte; fibrinoide Nekrosen (Pfeil) und Hämorrhagien; wenig interstitielles Ödem und zelluläre Infiltrate; Fbg. HE, Vergr. 600x

Nr.	EMB	Au	zelluläre Infiltrate	interstitielles Ödem	Myokard - nekrosen	Hämorrhagien	fibrinoide Nekrose
X1	-	+	(+)	-	++	+	++
X2	-	+	zum Zeitpunkt der Autopsie keine Abstoßung				
X3	-	+	zum Zeitpunkt der Autopsie keine Abstoßung				
X4	+	-	++	-	++	-	-
	-	+	++	-	++	-	-
X5	-	+	(+)	-	++	+	+
X6	-	+	+	-	++	++	++
X7	+	-	++	++	++	-	-
	+	+	-	+	+	+	-
	-	+	-	+	++	++	++
X8	-	+	+	-	++	+	+

Tab. 4

Darstellung der morphologischen Veränderungen in Endomyokardbiopsie (EMB) und Autopsie (Au), wie sie nach Abstoßung eines xenogenen Herztransplantates auftraten

Das Versuchstier X 4 wies in der Histologie wie im zytoimmunologischen Monitoring nur Veränderungen im Sinn einer zellulären Transplantatreaktion auf. Hund X 2 zeigte im zytoimmunologischen Monitoring eine zelluläre Transplantatreaktion.

Biopsien wurden bei diesem Tier nicht durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Autopsie konnte keine Abstoßung nachgewiesen werden. Hund X 3 zeigte während der gesamten Überlebenszeit weder in der Autopsie noch im Monitoring eine Transplantatreaktion. Die morphologischen Veränderungen der xenogenen Herztransplantate sind in Tab. 5 und 6 zusammengefaßt.

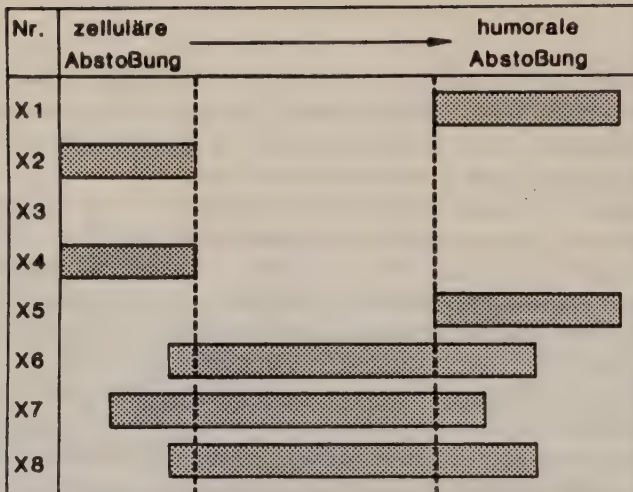
In 28,6 % (n = 2) konnte nach xenogener Herztransplantation eine rein zelluläre Transplantatreaktion beobachtet werden. Eine dieser beiden Abstoßungskrisen war trotz Methylprednisolontherapie irreversibel. Die Hunde X 6, X 7, X 8 wiesen typische humorale Veränderungen mit zellulären Infiltraten auf. Die Irreversibilität dieser gemischten humoro-zellulären Transplantatreaktion konnte mit Methylprednisolon zwar verzögert, aber nicht aufgehalten werden.

Zwei Tiere (X 1, X 5) entwickelten rein humorale Transplantatabstoßungen, die absolut therapieresistent waren (28,6 %).

Hund X 3 wurde in diesen prozentualen Berechnungen nicht berücksichtigt, da auf Grund der kurzen Überlebenszeit keine Abstoßungsreaktion diagnostiziert werden konnte.

Zusammenfassung:

Die Abstoßung xenogener Herztransplantate ist vielfältiger als die allogene Abstoßung. Sowohl zelluläre als auch humorale Transplantatreaktionen wie Übergangsformen traten auf.



Tab. 5

Typ der Abstoßungsreaktion nach xenogener Herztransplantation bei acht Versuchstieren

zelluläre Abstoßung	akut chronisch	n = 2 -	28,6 % -
zellulär/ humorale Abstoßung	akut chronisch	- n = 3	- 42,9 %
humorale Abstoßung	akut chronisch	n = 2 -	28,6 % -
keine Abstoßung		n = 1	-

Tab. 6

Jeweiliger prozentualer Anteil von zellulären und humoralen Abstoßungen bei sieben Versuchstieren mit xenogenen Herztransplant

Teil B

1. EINLEITUNG

Die immunologischen Probleme einer Herztransplantation sind bisher nur zum Teil gelöst. Ein Verlust des transplantierten Herzens durch Abstoßungsreaktion ist gleichbedeutend mit dem Tod des Patienten. Die immunologische Reaktionsfähigkeit des Empfängers bestimmt wesentlich dessen Schicksal.

In dem Bemühen um eine frühzeitige und sichere Diagnose einer Transplantatreaktion wurden zahlreiche immunologische Tests entwickelt und klinisch erprobt. Der Rosettentest (11, 29, 139) wies unter der konventionellen Therapie (Antithymozytenglobulin, Cortison, Azathioprin) gute Resultate auf (189). Er verlor seine Wertigkeit unter der neu eingeführten Ciclosporin Therapie (189). Andere Verfahren, wie der Immunoassay (146, 148) oder die Messung der Blastogenese (147), konnten sich klinisch nicht durchsetzen. Während für die Abstoßungsdiagnostik nach Nierentransplantation Stanzbiopsie und Aspirationszytologie (83) in Kombination mit der Differenzierung von Zellen des peripheren Blutes eine aussagekräftige Methode darstellt (93), lassen sich solche Verfahren aufgrund der besonderen Morphologie beim Herzen nicht durchführen. Der Kliniker kann bisher nur mit Hilfe der Endomyokardbiopsie (12) sicher eine Transplantatreaktion erkennen, wobei diese Methode nicht zur täglichen Anwendung geeignet ist. Somit ist bisher noch kein zuverlässiges und einfach durchzuführendes Verfahren mit Ausnahme der Endomyokardbiopsie entwickelt worden, das den klinischen Erfordernissen Rechnung trägt. Ziel des zweiten Teiles dieser Studie sollte die Entwicklung eines zytoimmunologischen Monitorings mit folgenden Fragestellungen sein:

1. Ist mit Hilfe des peripheren Blutes die Diagnose einer Abstoßungskrise frühzeitig und sicher möglich?
2. Stellt dieses neue Verfahren gegenüber der standardisierten Endomyokardbiopsie eine zuverlässige Methode zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion dar?
3. Ist eine Differentialdiagnose zwischen Abstoßung, bakterieller und viraler Infektion denkbar?
4. Kann das zytoimmunologische Monitoring die diagnostische Aufgabe der Endomyokardbiopsie übernehmen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zytoimmunologisches Monitoring

2.1.1 Gewinnung der Zellen

Als Untersuchungsmaterial für diese Studie dienten 5 ml venöses Blut, das mit 250 IE Heparin versehen wurde, um eine Gerinnung zu vermindern. Dieses Blut wurde dreimal pro Woche zu einem festgesetzten Zeitpunkt aus der Halsvene der Versuchstiere entnommen. Vor Transplantation wurden zwei Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Nach Abnehmen des Blutes sollten bis zu dessen Aufarbeitung zwei Stunden nicht überschritten werden, um einen konstanten pH-Wert beizubehalten.

2.1.2 Bearbeitung des Blutes

2.1.2.1 Leukozyten

Die Berechnung der Leukozyten/mm³ wurde sowohl maschinell¹⁾ als auch unter³⁾ Verwendung einer Neubauer-Zählkammer²⁾ im Hellfeld-Mikroskop bei 10facher Vergrößerung durchgeführt.

2.1.2.2 Differentialblutbild

Je Versuchstier wurden sechs entfettete Objektträger⁴⁾ mit Name des Tieres, Datum und fortlaufender Nummer versehen, wobei zwei Objektträger für den Blutausstrich und vier für die Zellsuspension des mononukleären Konzentrates verwendet wurden. Zur Anfertigung der Blutausstriche wurde je ein Tropfen heparinisierten Blutes auf dem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet (9).

2.1.2.3 Herstellung des mononukleären Konzentrates

Je 2,5 ml des heparinisierten Blutes wurden nach 1:1-Verdünnung⁵⁾ mit Tris-Hank'scher Lösung auf 2-3 ml Ficoll-Isopaque-Lösung⁶⁾

1) Hematology Analyzer 5, Fa. Clay Adams

2) Neubauer-Zählkammer, bezogen über Fa. Empfenzeder, München

3) Hellfeld-Mikroskop, Fa. Zeiss

4) Objektträger, 76 x 26 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen

5) Hank'sche Lösung, Klinikapotheke, Klinikum Großhadern

6) Fikoll-Isopaque-Lösung (D=1,077), Klinikapotheke, Klinikum Großhadern

(spezifische Dichte: 1,077 g/ml) geschichtet. Durch 20minütige Zentrifugation bei 1200 g (entsprechend 2800 Umdrehungen pro Minute) in der Rotanda-S-Zentrifuge¹⁾ erhält man das sogenannte "mononukleäre Konzentrat", als Interphasenring zwischen Serum und der Ficoll-Isopaque-Lösung (23). Dieses mononukleäre Konzentrat besteht im wesentlichen aus Lymphozyten und Monozyten (23). Die restlichen Blutzellen, d.h. Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten bilden aufgrund ihrer höheren Dichte den Bodensatz der Reagenzgläser.

Dieser Interphasenring wurde daraufhin mit einer Pasteur-Pipette isoliert. In einem neuen Reagenzglas wurde das mononukleäre Konzentrat in Tris-Hank'scher Lösung resuspendiert und dreimal bei 600 G (entspricht 1400 Upm) gewaschen. Nach Abgießen des Überstandes wurde die Suspension entsprechend einer Konzentration von 1 - 3 x 10⁶ mononukleärer Zellen /mm³ mit Hank'scher Lösung aufgefüllt.

2.1.3 Bearbeitung der mononukleären Suspension

2.1.3.1 Erstellung der Präparate

Vier der sechs beschrifteten Objektträger wurden mit einem speziell perforierten Filzkarton²⁾ belegt und zusammen mit der entsprechend aufgesetzten Küvette in die Zytozentrifuge³⁾ eingespannt. Die Austrittsöffnung der Küvette sollte dabei über dem ausgestanzten Loch⁴⁾ des Filzkartons zu liegen kommen. Mittels Eppendorf-Pipetten wurden in je zwei Küvetten 10 ul bzw. 20 ul der aufgeschüttelten Suspension von mononukleären Zellen übertragen und mit 150 ul Hank'scher Lösung verdünnt. Die Präparate wurden anschließend fünf Minuten mit einer Umdrehungszahl von 500/Minute (entspricht 300 G) zentrifugiert. Die Zellen kamen in der Regel in einer rund begrenzten Anhäufung auf dem Objektträger

-
- 1) Zentrifuge Rotanda S für Zentrifugation bis 4500 Upm,
Fa. Hettich, Tuttlingen
 - 2) Filter Cards, Cat. No. 599 x 45, Shandon
 - 3) Cytozentrifuge mit Küvetten, Cytospin 1, Shandon,
Labortechnik GmbH, Frankfurt
 - 4) Eppendorf-Pipette 3130, Eppendorf Gerätebau, Netheler &
Hinz GmbH, Hamburg

zu liegen. Das Kulturmedium wurde von dem Filzkarton aufgesaugt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Präparate entnommen und 20 Minuten luftgetrocknet

2.1.3.2 Markierung der Zellen mit Antikörpern

Als Ergänzung wurde die direkte Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei werden fluoreszierende Farbstoffe wie Fluoreszein oder Rhodamin an Antikörper gekoppelt, ohne deren Spezifität zu zerstören. Diese Konjugate können sich mit Antigenen auf der Zelloberfläche binden und im ultravioletten Licht durch Emission von Fluoreszenz mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise kann die Verteilung der Antigene im Gewebe oder eine bestimmte Subpopulation von Zellen sichtbar gemacht werden (176) (Abb.13).

In dieser Studie wurde vor allem Augenmerk auf die Unterscheidung von IgG-positiven und IgG-negativen Zellen Wert gelegt. Unter IgG-positiven Zellen sind diejenigen Zellen zu verstehen, welche auf ihrer Oberfläche Immunglobulin G tragen. Diese Moleküle wurden mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

Verwendet wurde ein mit Fluoreszein konjugierter Anti-Hunde-IgG Antikörper¹⁾, der durch Sensibilisierung von Kaninchen mit Hunde- Immunglobulin G gewonnen wurde (106, 109). Dieser Antikörper bindet sich vor allem an B-Lymphozytenoberflächenglobuline, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß er über sein Fc-Ende auch Teile der Monozyten und aktivierten Lymphozyten markiert. (4, 61, 106, 121, 135, 166)

An der Lymphozytenoberfläche fluktuieren diese Immunglobuline (ähnlich wie Eisberge im Wasser) frei in der Plasmamembran in einem Meer von Lipiden. Wurde die Reaktion in Kälte ausgeführt, um eine Pinozytose der Antikörper in das Zellinnere zu vermeiden, ergab sich unter dem Mikroskop eine ringförmige Fluoreszenz (176) (Abb. 14)

1) Anti-Dog IgG vom Kaninchen, Fa. Miles-Yeda LTD, Elkhart, Ind. 46514, USA

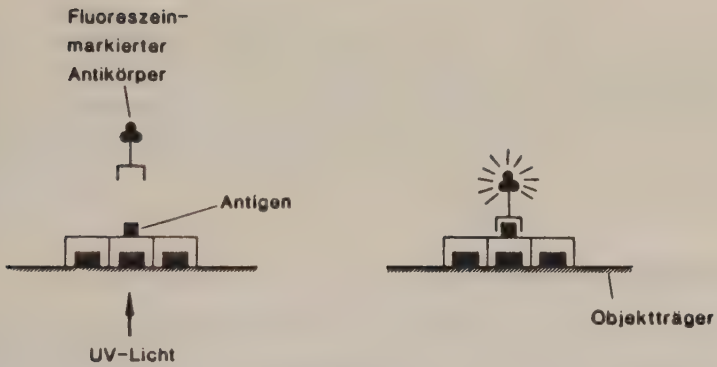


Abb. 13

Schematische Darstellung der direkten Immunfluoreszenztechnik

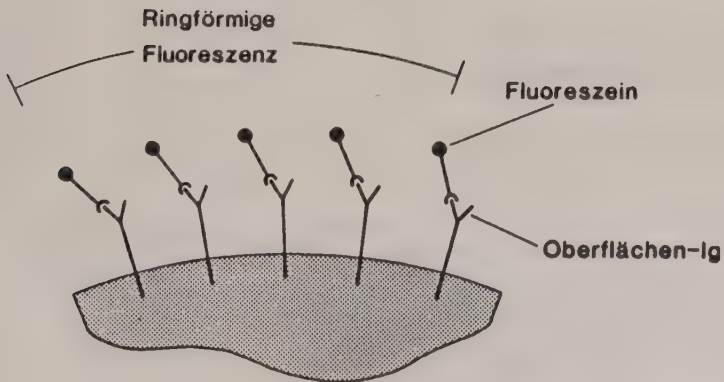


Abb. 14

Schematische Darstellung der ringförmigen Fluoreszenz nach Zusatz von monovalentem anti-IgG

Zur Durchführung dieser Technik wurden 100 μ l der mononukleären und auf $1 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellten Suspension mit 30 μ l verdünnter Antikörpersuspension 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die käufliche Antikörperlösung wurde hierzu 1:10 mit 0,9 % Kochsalzlösung verdünnt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die überschüssigen, d.h. nicht an Zellen gebundenen Antikörper mit 2 ml isotoner Kochsalzlösung¹⁾ aufgeschwemmt, mittels Zentrifugation bei 300 G herausgewaschen und der Überstand bis auf etwa 30 - 50 μ l abgehoben.

2.1.4 Färbung nach Pappenheim

Die Ausstrichpräparate und Zytozentrifugenpräparate wurden durch die panoptische Färbung nach Pappenheim zur Differenzierung vorbereitet (9). Die Pappenheim-Färbung besteht aus May-Grünwald-Stammlösung²⁾ und Giemsa-Lösung³⁾. Die Verwendung von basischen (Methylenblau) und sauren (Eosin) Farbstoffen erlaubt eine gute morphologische Zellbeurteilung. Die Präparate wurden randfrei und waagrecht auf einer Färbepank platziert und mit konzentrierter May-Grünwald-Stammlösung überschichtet. Nach drei Minuten wurden die Präparate mit Aqua bidest⁴⁾ abgespült und anschließend mit neu filtrierter Giemsa-Lösung (1 Volumenanteil Giemsa-Stammlösung auf 19 Volumenanteile Aqua bidest) überschichtet. Nach 20minütiger Färbezeit wurde mit reichlich Aqua bidest nachgespült und die Präparate erneut luftgetrocknet.

Angetrocknete Farbspuren⁵⁾ auf der Präparatrückseite konnten mit Salzsäure-Äthanol-Lösung entfernt werden. Zum Schutz des Präparates wurden die getrockneten⁶⁾ und gefärbten Zytozentrifugenpräparate mit Hilfe von Eukitt mit einem Deckplättchen⁷⁾ versehen.

1) Isotone Kochsalzlösung, Klinikapotheke, Klinikum Großhadern

2) May-Grünwald-Lösung modifiziert, Fa. Merck, Darmstadt

3) Giemsalösung, Fa. Merck, Darmstadt

4) Aqua bidest, Klinikapotheke, Klinikum Großhadern

5) Salzsäure-Äthanol, 0,75 %, Fa. Empfenzeder, München

6) Eukitt, O. Kindler, Freiburg i.B.

7) Deckplättchen aus Glas, 18 x 18 mm, Fa. Menzel, bezogen über Fa. Empfenzeder, München

2.1.5 Differenzierung der Zellen

2.1.5.1 Mikroskopische Grundlagen

Die Zelldifferenzierung von Ausstrich- und Zytozentrifugenpräparaten erfolgte mit einem Universal-Mikroskop¹⁾. Die auszuzählenden Zellen wurden durch Eintippen in ein Zählgerät²⁾ gespeichert. Zunächst wurde das zu differenzierende Präparat bei 120facher Vergrößerung (12fach vergrößerndes Okular + 10fach vergrößerndes Objektiv begutachtet, um sich einen Überblick zu verschaffen und eine geeignete repräsentative Region aufzusuchen.

Bei schlechter Färbung oder zu dicht belegenden Zellen sollte das Präparat verworfen werden, da eine exakte Differenzierung unmöglich ist.

Nach Einstellen eines geeigneten Gesichtsfeldes bei 400facher Vergrößerung wurde mit Hilfe des Immersions-Objektives unter Verwendung von Immersionsöl³⁾ bei 1200facher Vergrößerung des Präparates differenziert. Es wurden 2 x 100 Zellen der Ausstrichpräparate und je 100 Zellen der vier Zytozentrifugenpräparate ausgezählt.

Die endgültigen Ergebnisse errechneten sich aus den Mittelwerten der Mehrfachdifferenzierung.

2.1.5.2 Differenzierung der Präparate

Entsprechend zytologischer und hämatologischer Kriterien (9, 98, 99) fanden polynukleäre Zellen bzw. mononukleäre Zellen der Myelo- und Lymphopoese mit ihren aktivierten Formen Berücksichtigung.

Sowohl die Ausstrichpräparate als auch die Zytozentrifugenpräparate wurden nach den gleichen Kriterien differenziert.

1) Zeiss-Mikroskop, Standard 18

2) Zählapparat, Leucodiff 600, Instrumentation Laboratory
Boskamp GmbH

3) Immersionsöl, Klinikapotheke, Klinikum Großhadern

I) Myelopoese

Juvenile Granulozyten:

die Zellgröße beträgt 12 - 16 µm. Das Zytoplasma ist blaßrot tingiert und weist entsprechend der Funktion spezifische neutrophile, basophile oder eosinophile Granula auf. Der Zellkern ist bohnenförmig gewunden, weist grobscholliges Chromatin auf und ist von rötlich-violetter Färbung.

Stabkernige Granulozyten:

Die Zellgröße liegt zwischen 10 und 15 µm. Das Zytoplasma ist blaßrosa gefärbt. Feine Granula sind sichtbar. Der Zellkern ist stabförmig mit Schnürfurchen bis zu einem Drittel der durchschnittlichen Kerndicke. Die Farbe des Kernes ist rötlich-violett, das Chromatin grobkörnig-schollig strukturiert.

Segmentkernige Granulozyten:

Die Zellgröße variiert zwischen 11 und 16 µm. Das Zytoplasma stellt sich blaßrosa dar. Entsprechend der Farbe der Granula wird zwischen neutrophilen (grau-blaue Granula), eosinophilen (orange-rote Granula) und basophilen (tief blaue Granula) Granulozyten unterschieden. Die Einschnürungen der Zellkerne überschreiten ein Drittel der durchschnittlichen Kerndicke. In den meisten Fällen sind die Kernsegmente nur durch feine Brücken miteinander verbunden. Das Chromatin ist grobkörnig bis grobschollig; die Farbe des Zellkerns rötlich-violett.

Monozyten:

Entsprechend der Größe werden kleine (bis 15 µm) und große (bis 20 µm) Monozyten unterschieden. Das Zytoplasma ist taubenblau gefärbt. Bei Übergang in Makrophagen treten häufig Vakuolen auf. Der Zellkern ist vorwiegend nierenförmig, bisweilen auch segmentiert, überlappend und dunkelblau.

II) Lymphopoese

Kleine Lymphozyten (Abb. 15):

Die Zellgröße reicht von 7 - 10 μ m. Die Zelle selbst ist rund. Der bohnenförmige bis runde Zellkern färbt sich tief dunkelblau und füllt nahezu die Zelle aus. Das Chromatin ist dicht strukturiert. Der meist nur einseitig vorhandene schmale Zytoplasmasaum ist basophil.

Große Lymphozyten:

Die Zellgröße beträgt 10 - 16 μ m. Der Zytoplasmasaum ist deutlich breiter als bei kleinen Lymphozyten und intensiver basophil gefärbt. Kleinste Vakuolen bedingen eine perinukleäre Aufhellung. Der ovale Zellkern mit seinem dichten Chromatin ist meist exzentrisch gelegen.

Lymphatische Reizformen (Abb. 15):

Diese Zellen werden auch als Prälymphoblasten oder aktivierte Lymphozyten bezeichnet.

Der Zelldurchmesser beträgt 10 - 18 μ m. Das Zytoplasma färbt sich intensiv basophil. Die Kernplasmarelation nimmt im Vergleich zum normalen Lymphozyten deutlich zugunsten des Zytoplasmas zu. Es erfolgt eine Auflockerung der scholligen Chromatinstruktur des meist runden Zellkerns gegenüber dem normalen Lymphozyten. Gelegentlich werden Nukleoli sichtbar.

Immunoblasten:

Diese Zellen entsprechen der Endform von aktivierten Lymphozyten und werden je nach Funktion als Plasmazellen oder Lymphoblasten bezeichnet.

Plasmazellen:

Die Zellgröße liegt zwischen 7 und 15 μ m. Das Zytoplasma ist tiefblau. Der Zellkern zeigt eine sehr dichte, oft radspeichenartige Struktur bei meist exzentrischer Lage.

Die Kernplasmarelation hat sich weiter zugunsten des Zytoplasmas verschoben. Eine perinukleäre Aufhellungszone ist deutlich abgrenzbar.

Die Plasmazelle gehört den B-Lymphozyten an.

Lymphoblasten (Abb. 15):

Die Zellgröße kann bei starker Stimulation bis zu 30 µm erreichen. Das Zytoplasma ist intensiv basophil und die Kernplasmarelation entsprechend der Plasmazelle zugunsten des Zytoplasmas verschoben.

Der rundliche Kern zeigt eine aufgelockerte Struktur und einen Nukleolus. Der Lymphoblast wird den T-Lymphozyten zugerechnet.

2.1.6 Auswertung der Immunfluoreszenz

Um eine Schwächung der Fluoreszenz zu vermeiden, sollte sofort nach Ende der Inkubation mit dem Auszählen begonnen werden. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde ein kleiner Tropfen der mit IgG-Antikörpern markierten Zellsuspension auf einen sauberen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop¹⁾ erfolgte die Auszählung²⁾ von 2 x 100 Zellen im Durchlicht bei 400facher Vergrößerung³⁾. Bei Verwendung⁴⁾ einer Halogenlampe und Zwischenschaltung spezifischer Filter erhielt man im Dunkelfeld des Ölinversionskondensators einen dunkelroten Zellkörper in Verbindung mit leuchtend apfelgrünen Fluoreszenzen.

Die positiven Zellen unterschieden sich von den negativen Zellen durch eine deutliche ringförmige Fluoreszenz. Streng abzugrenzen von positiven und negativen mononukleären Zellen waren evtl. vorhandener Zellschutt bzw. die bläschenartig aussehenden Erythrozyten.

Die IgG-positiven Zellen pro 100 mononukleärer Zellen wurden prozentual festgehalten.

1) Zeiss Universal Fotomikroskop, Fa. Zeiss, 7082 Oberkochen

2) Objektive: Ph 2, Plan, 40/0, 65, 160/0, 17; Neufleur 40/0, 75, 160/0, 17

3) Halogenleuchte 12 V, 100 W

4) KP 500 Kurzpassfilter; BP 38 Rotfilter

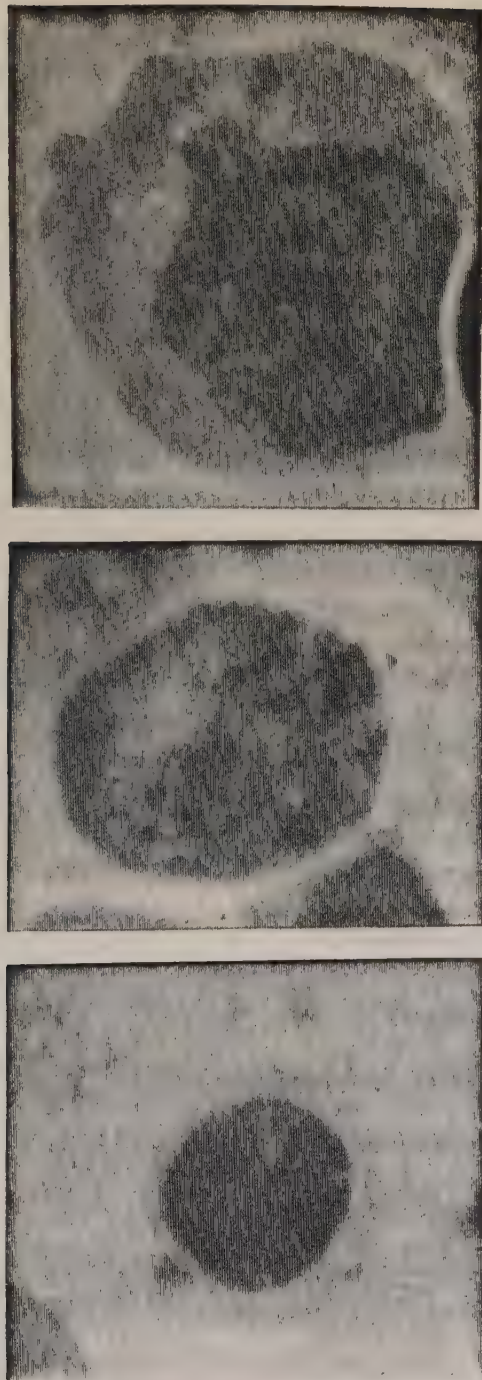


Abb. 15

Kleiner Lymphozyt (a), Prälymphoblast (b) und Lymphoblast (c) - Färbung nach Pappenheim; 1200 fache Vergrößerung mit dem Immersionsobjektiv

2.1.7 Quantitative Auswertung

Ziel der im folgenden beschriebenen Schemata war die Errechnung der Absolutzahlen/mm³ für alle Leukozytensubpopulationen.

2.1.7.1 Subpopulationen der Leukozyten

Die Absolutzahlen /mm³ Blut für Lymphozyten, Monozyten und stabkernige Granulozyten errechneten sich aus dem prozentualen Anteil dieser Zellen im Ausstrichpräparat und der Gesamtzahl der Leukozyten/mm³ (Abb. 16).

2.1.7.2 Subpopulationen der Lymphozyten

Aus der Gesamtzahl (siehe 2.1.7.1) der Lymphozyten/mm³ und dem prozentualen Anteil von Lymphoblasten und Prälymphoblasten bezogen auf alle Lymphozyten im mononukleären Konzentrat konnten die jeweiligen Absolutzahlen/mm³ für diese Zelltypen errechnet werden. Entsprechend erhielt man die Absolutzahl/mm³ für IgG-positive Zellen aus dem prozentualen Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten im mononukleären Konzentrat (Abb. 16).

Die IgG-negativen Zellen/mm³, vor allem T-Lymphozyten, ergaben sich durch Subtraktion der IgG-positiven Zellen/mm³ von der Gesamtzahl der Lymphozyten/mm³.

2.1.7.3 Verhältnis IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen

Aus den Absolutzahlen von IgG-negativen und IgG-positiven Zellen wurde das Verhältnis dieser Zellen zueinander errechnet.

2.2. Histologische Grundlagen

2.2.1 Die Endomyokardbiopsie

Die Endomyokardbiopsien aus dem transplantierten Herzen wurde nach der von Caves entwickelten Technik entnommen (35, 38, 39, 40). Nach perkutaner Einführung des

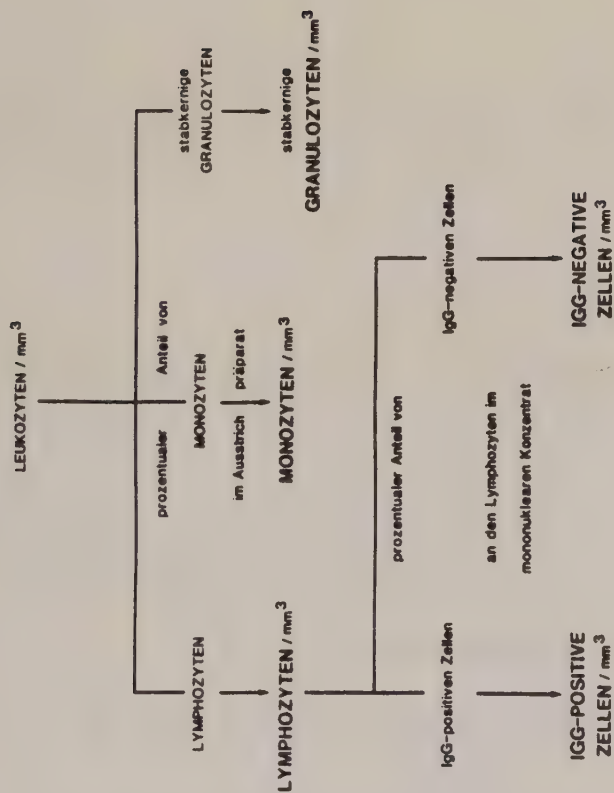


Abb. 16

Graphische Darstellung der Errechnung von Absolutzahlen für Subpopulationen der Leukozyten

Biotoms (Abb. 17) in die rechte Vena jugularis externa mit Hilfe eines speziellen Besteckes¹⁾ wurde unter Röntgenkontrolle das Biotom über die Vena cava superior, die Anastomose und die Arteria pulmonalis in den rechten Ventrikel des transplantierten heterotopen Herzens vorgeschoben (Abb. 18). Für eine gute morphologische Beurteilung des Endo- bzw. Myokards waren drei bis vier Biopsien aus verschiedenen Teilen des rechten Ventrikels und des Septums nötig. Die Gewebeproben wurden mit 10 % gepuffertem Formalin²⁾ fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin bzw. der Masson's Trichrome-Färbung gefärbt. Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate ermöglichten einen Überblick über die allgemeine Morphologie des Gewebes. Die nach Masson gefärbten Präparate verdeutlichten den Grad und das Ausmaß der Fibrosierung des Myokards.

2.2.2 Die Autopsie

Die Versuchstiere wurden autopsiert, wenn diese an einer Infektion verstorben waren bzw. aufgrund einer Asystolie des transplantierten Herzens eingeschläfert werden mußten.

Es wurden Gewebeproben aus dem transplantierten Herzen bzw. aus Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere des Versuchstieres entnommen, um einerseits die Todesursache zu klären und andererseits durch Ciclosporin verursachte Parenchymschäden diagnostizieren zu können. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.3. Messung des Herzgewichtes

Das transplantierte Herz wurde vor Implantation gewogen. Nach dem Tod des Versuchstieres erfolgte die Explantation des

1) Catheter Sheath Introducer System, Fa. Cordis Corporation, Miami, FL 33102-5700, USA

2) Formaldehyd, Klinikapotheke, Klinikum Großhadern

Herzens. Durch Spülung in isotoner Kochsalzlösung wurde das Herz von Blutkoageln befreit und sein jetziges Gewicht bestimmt. Durch Vergleich beider Werte sollte die Auswirkung einer Abstoßungsreaktion mit dem damit verbundenen interstitiellen Ödem des Endo- und Myokards dokumentiert werden.

2.4. Statistik

Für die Berechnung von Wertepaaren wurde der gepaarte t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Alle Werte sind als Mittelwert + mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben.

Signifikante Unterschiede wurden in den Abbildungen mit einem Asterix für $p \leq 0,05$ bzw. zwei Sternchen für $p \leq 0,025$ gekennzeichnet.

Die Wertigkeit des zu untersuchenden Tests errechnete sich nach dem Prinzip der 4-Felder-Tafel zweier stöchiometrisch verschiedener Parameter. Die Validität wurde mit Hilfe der Prozentzahlen für Sensitivität, Spezifität und Vorhersagerichtigkeit zum Ausdruck gebracht.



Abb. 17

Das Caves-Schulz-Biotom

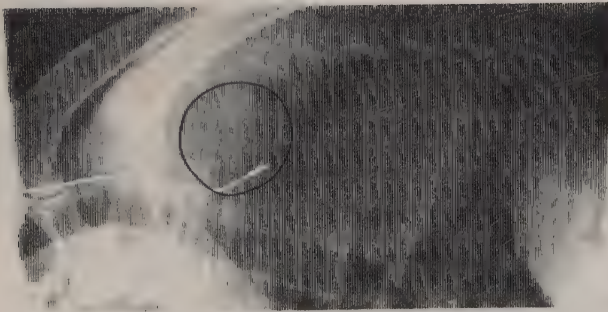
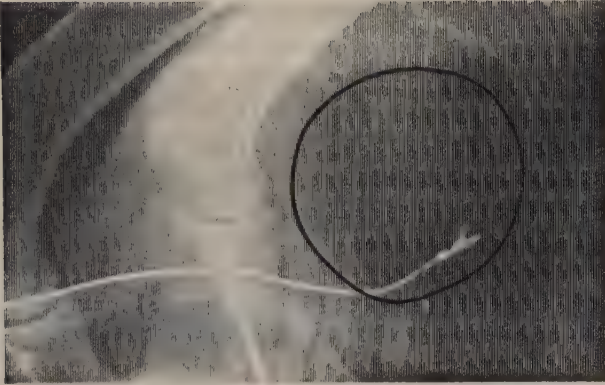


Abb.18

Thorax im antero-posterioren Strahlengang. Darstellung des Biotoms im rechten Ventrikel des transplantierten Herzens

3. ERGEBNISSE

3.1 Immunologische Ergebnisse

Anhand der dreimal pro Woche erhaltenen Daten des zytoimmunologischen Monitorings konnten in Verbindung mit klinischen und histologischen Daten die Fluktuationen der Leukozyten während inflammatorischer Ereignisse im Empfängerorganismus untersucht werden. Die in den Abbildungen 19 - 42 dargestellten Säulen entsprechen den Durchschnittswerten der Tage, an welchen das jeweilige inflammatorische Ereignis mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings festgestellt und die Diagnose durch histologische oder mikrobiologische Untersuchungen bestätigt wurde. Kontrollwerte sind dementsprechend Durchschnittswerte von Tagen, an denen keine inflammatorische Reaktion des Empfängertieres nachweisbar war.

3.1.1 Die zelluläre Abstoßung

Es konnten sechs zelluläre Transplantreaktionen ($n = 6$) ohne Überlagerung von bakteriellen oder viralen Infektionen diagnostiziert werden. Die Diagnose wurde mittels Endomyokardbiopsie oder Autopsie gesichert.

Abbildung 19 und 20 zeigen die quantitativen Veränderungen von Leukozyten/ mm^3 und deren Subpopulation vor und während der zellulären Abstoßungsreaktion.

Das periphere Blutbild

Leukozyten/ mm^3 ($p \leq 0,05$) sowie Lymphozyten/ mm^3 ($p \leq 0,025$) stiegen während der Abstoßungsreaktion signifikant an. Die Monozyten/ mm^3 und stabkernige Granulozyten/ mm^3 zeigten erwartungsgemäß keine Veränderungen (Abb. 19).

Das mononukleäre Konzentrat

Die aktivierten Lymphozyten/ mm^3 (Lymphoblasten und Prälymphoblasten) im mononukleären Konzentrat stiegen signifikant um 472 % ($p \leq 0,025$) an. Der prozentuale Anteil dieser aktivierten Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten wuchs ebenso

signifikant an ($p \leq 0,005$) wie das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen ($p \leq 0,01$) (Abb. 20).

3.1.2 Einfluß der Methylprednisolontherapie während zellulärer Abstoßung

In fünf der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen sechs Fällen von zellulärer Abstoßung konnte ein Effekt der Cortisontherapie auf die Leukozyten nachgewiesen werden. Ein Transplantat (Hund A 1) flimmerte, nachdem durch eine zelluläre Abstoßungsreaktion und einer damit verbundenen Kontraktilitätsminderung des Myokards eine Strömungsverlangsamung in den Koronararterien auftrat und zur Thrombose derselben führte.

Abbildung 21 und 22 zeigen die Veränderungen der Leukozytensubpopulationen während der beginnenden Abstoßungsreaktion und nach erfolgreicher Methylprednisolontherapie.

Das periphere Blutbild

Leukozyten/mm³, Lymphozyten/mm³ und Monozyten/mm³ wiesen keine signifikanten Veränderungen auf. Ähnlich verhielten sich die stabkernigen Granulozyten/mm³ (Abb. 21).

Das mononukleäre Konzentrat

Das mononukleäre Konzentrat zeigte eine deutliche Beeinträchtigung der Lymphozytenproliferation, die zu einem signifikanten Abfall von aktivierten Lymphozyten/mm³ ($p \leq 0,025$) und einem damit verbundenen geringerem prozentualen Anteil dieser Zellen an den Gesamtlymphozyten ($p \leq 0,025$) führte. Auch das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen verschob sich um 165 % zu Gunsten der B-Lymphozyten. ($p \leq 0,05$) (Abb. 22).

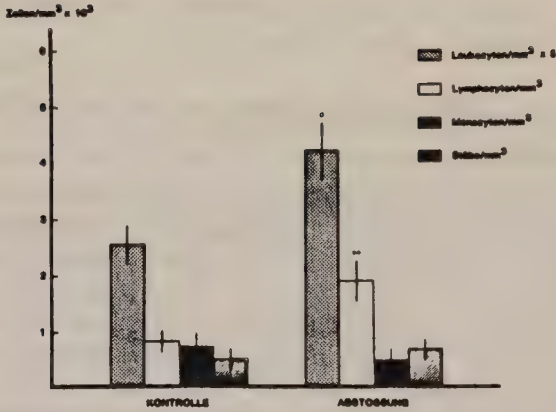


Abb. 19

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten vor und während zellulärer Abstoßung (n=6)

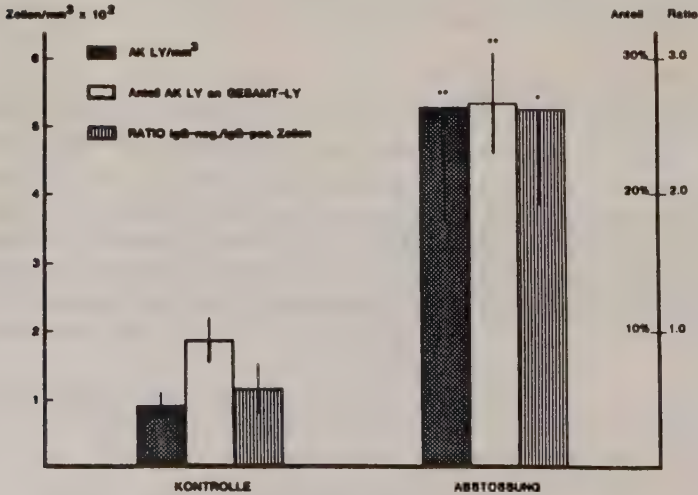


Abb. 20

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ vor und während zellulärer Abstoßung (n=6)

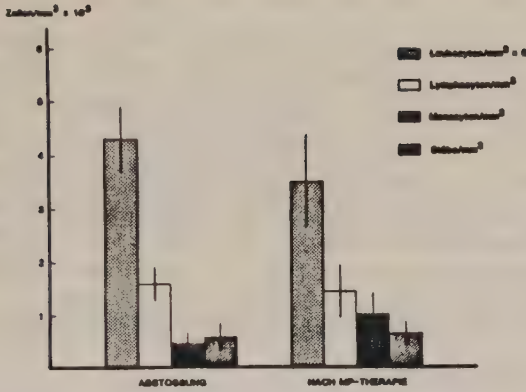


Abb. 21

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten während zellulärer Abstoßung und nach Methylprednisolontherapie (n=5)

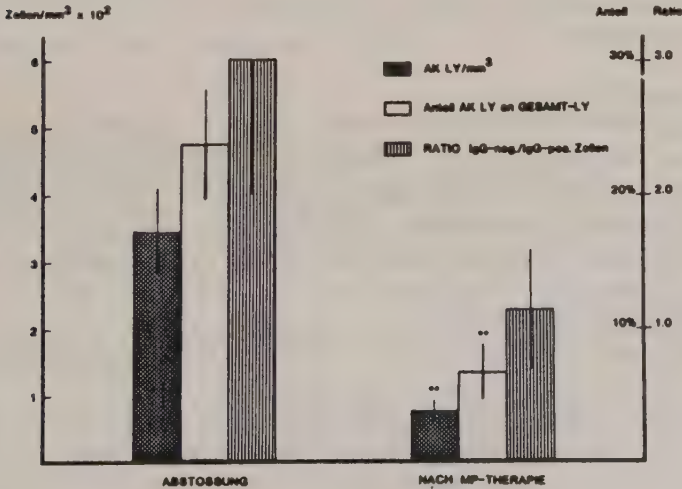


Abb. 22

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ während zellulärer Transplantatabstoßung und nach Methylprednisolontherapie (n=5)

Zusammenfassung

Die zelluläre Transplantatreaktion zeichnet sich durch eine Lymphozytenproliferation in Verbindung mit einer Blastogenese aus. Diese Veränderungen sind sowohl im peripheren Blutbild (Lymphozyten/mm³) als auch im mononukleären Konzentrat (aktivierte Lymphozyten) zu erkennen. Vor allem ein Anstieg der T-Lymphozyten könnte für diese Veränderungen verantwortlich sein. Spricht die Methylprednisolontherapie an, sind diese Veränderungen innerhalb weniger Tage reversibel. Als typischer Cortisoneffekt läßt sich eine relative Lymphozytopenie beobachten.

3.1.3 Die bakterielle Infektion

Bakterielle Infektionen (n = 5) ohne eine parallel verlaufende Abstoßung oder eine virale Infektion konnten bei 5 Versuchstieren diagnostiziert werden. Die Sicherung der Diagnose wurde anhand der Mikrobiologie durchgeführt.

Protozoeninfektionen wie die generalisierten Toxoplasmose wurden der bakteriellen Infektion zugerechnet, da die Veränderungen der Leukozyten und deren Subpopulationen denen des bakteriellen Infektes entsprachen.

Das periphere Blutbild.

Entsprechend der klinischen Erfahrung erfolgte ein deutlicher Anstieg von Leukozyten/mm³ ($p \leq 0,025$) und stabkernigen Granulozyten/mm³ ($p \leq 0,005$) im Sinne einer Linksverschiebung. Die Lymphozyten/mm³ sanken geringfügig, während die Monozyten/mm³ eine nicht signifikante Steigerung um 32 % erfuhren (Abb. 23).

Das mononukleäre Konzentrat

Nach Auftreten einer bakteriellen Infektion wies das mononukleäre

Konzentrat nur eine geringgradige Aktivierung auf. Der prozentuale Anteil aktivierter Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten stieg allerdings bedingt durch einen Abfall der Gesamtlymphozyten signifikant an ($p \leq 0,05$). Das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen/mm³ sank ab ($p \leq 0,01$) (Abb. 24).

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, ergibt sich ein relativer Anstieg der IgG-positiven Zellen/mm³ bei leicht fallenden Gesamtlymphocyten/mm³ (Abb. 24) und starkem Absinken der IgG-negativen Zellen/mm³.

3.1.4 Einfluß der Antibiotikatherapie auf die bakterielle Infektion

In drei der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen bakteriellen Infektionen konnte ein Ansprechen der verabreichten Antibiotika beobachtet werden. Zwei Tiere erlitten eine tödliche Sepsis (Versuchstiere A 2, A 3).

Das periphere Blutbild

Leukozyten/mm³ ($p \leq 0,025$), Monozyten/mm³ und stabkernige Granulozyten/mm³ ($p \leq 0,025$) sanken bei Ansprechen der Antibiotikatherapie auf annähernd Normalwerte ab. Die Lymphozyten/mm³ stiegen relativ an. (Abb. 25).

Das mononukleäre Konzentrat.

Nach Antibiotikagabe konnte ein Anstieg aktivierter Lymphozyten/mm³ bzw. ein Abfall des prozentualen Anteils dieser Zellen an der Gesamtlymphocyten/mm³ diagnostiziert werden. Das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen/mm³ stieg signifikant ($p \leq 0,025$) an, erreichte aber noch nicht Normalwerte (Abb. 26).

Zusammenfassung:

Die bakterielle Infektion äußert sich in einer Leukozytose und einer Linksverschiebung des Differentialblutbildes, d.h. ein An-

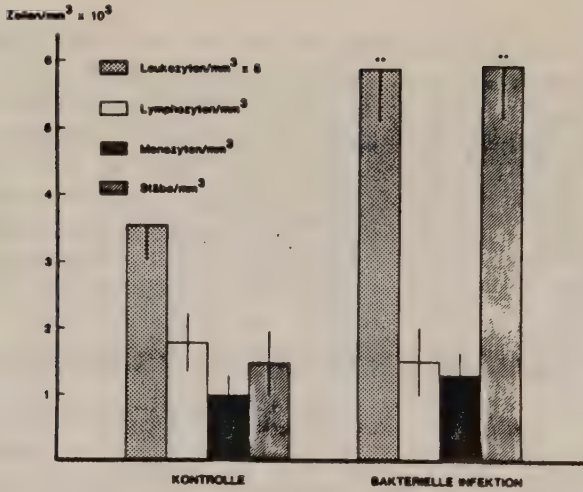


Abb. 23

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten vor und während bakterieller Infektion (n=5)

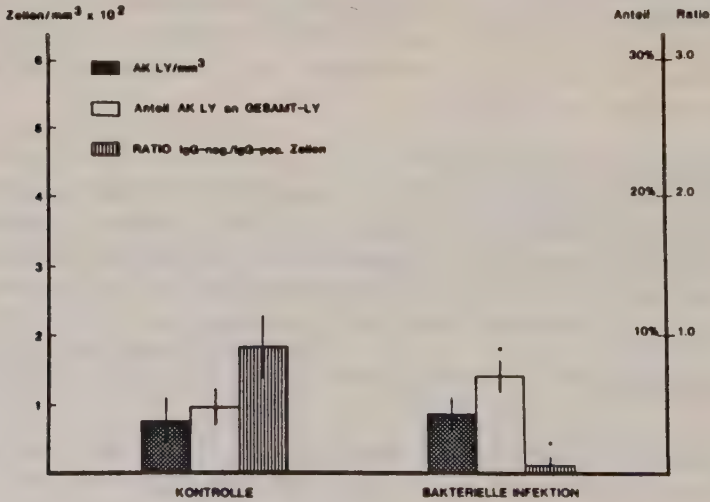


Abb. 24

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ vor und während bakterieller Infektion (n=5)

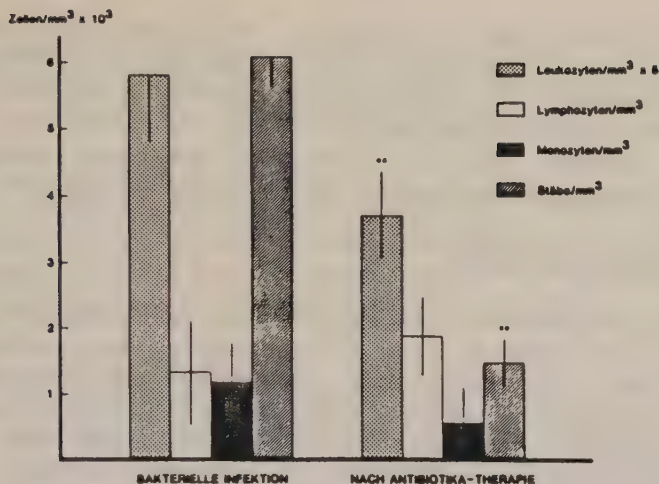


Abb.25

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten während bakterieller Infektion und nach Antibiotikatherapie (n=3)

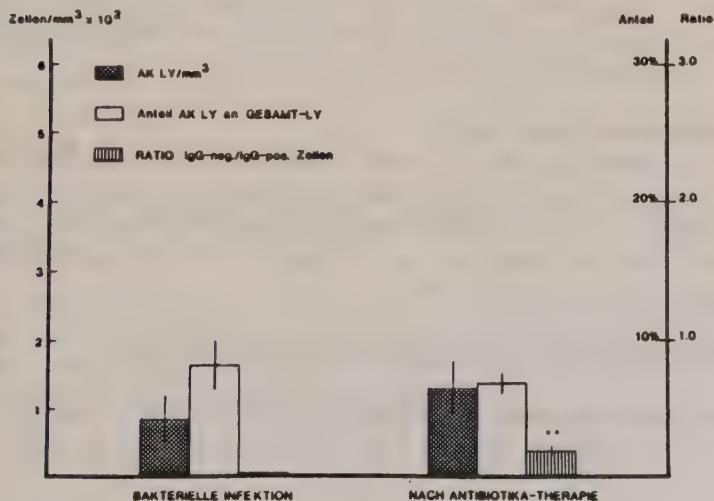


Abb.26

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ während bakterieller Infektion und nach Antibiotikatherapie (n=3)

stieg der stabkernigen Granulozyten. Eine Blastogenese findet nicht statt. Die Immunantwort wird auf dem Weg der Antikörperbildung vermittelt. Dies äußert sich in einem Abfall des Verhältnisses IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen.

Deutliche Merkmale einer Regression sind Normozytose, fehlende Linksverschiebung und ein Anstieg der IgG-negativen Zellen.

3.1.5 Die virale Infektion

Bei fünf Versuchstieren wurde mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings die Diagnose einer viralen Infektion ohne parallelen Verlauf einer Abstoßungsreaktion oder einer bakteriellen Infektion gestellt. Da keine Serologie durchgeführt werden konnte, wurde die Diagnose als Ausschlußdiagnose gestellt, bzw. nach Tod des Versuchstieres durch die Autopsie nachgewiesen. Klinische Parameter wie Fieber, Husten, Schleimbildung in den Bronchien sicherten die Diagnose.

Das periphere Blutbild

Virale Infektionen zeichneten sich weder durch eine Leukozytose noch durch Leukopenie aus. Die Monozyten/mm³ und stabkernigen Granulozyten/mm³ blieben unverändert, während die Lymphozyten/mm³ um 138 % anstiegen ($p \leq 0,05$) (Abb. 27).

Das mononukleäre Konzentrat.

Das mononukleäre Konzentrat wies einen statistisch gesicherten Anstieg der Prälymphoblasten und Lymphoblasten ($p \leq 0,05$) bzw. deren Anteil an den Gesamtlymphozyten/mm³ auf ($p \leq 0,05$). Das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen sank signifikant ab ($p \leq 0,025$) (Abb. 28).

3.1.6 Therapeutischer Einfluß auf die virale Infektion.

Vier von fünf Versuchstieren konnten mit Hilfe einer symptomatischen Therapie geheilt werden, das Tier (A7) verstarb an einer

Virussepsis. Unter einer symptomatischen Therapie verstanden wir die Verabreichung von Infusionen, Immunglobulinen und Antibiotika zur Prophylaxe einer bakteriellen Superinfektion.

Das periphere Blutbild

Monozyten/mm³ wie stabkernige Granulozyten/mm³ wiesen bei gleichbleibender Leukozytenzahl leichte Veränderungen im Sinne eines Anstieges auf. Die Lymphozyten/mm³ sanken bei Abklingen der viralen Infektion signifikant ab ($p \leq 0,025$) (Abb. 29).

Das mononukleäre Konzentrat.

Die Zahl aktivierter mononukleärer Zellen/mm³ nahm bei Ansprechen der Therapie signifikant ab ($p \leq 0,025$). Entsprechend dazu sank der Anteil dieser Zellen im Verhältnis zu den Gesamtlymphozyten um 42 % (nicht signifikant). Das Verhältnis IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen näherte sich Normalwerten (nicht signifikant) (Abb. 30).

Zusammenfassung

Charakteristische Merkmale der viralen Infektion sind eine Lymphozytose im peripheren Blutbild bzw. eine damit verbundene Blastogenese sichtbar im mononukleären Konzentrat. Die Antwort des Immunsystems erfolgt vor allem über die Antikörperbildung (Anstieg IgG-positiver Zellen).

3.1.7 Die zelluläre Abstoßung im Verlauf einer bakteriellen Infektion

Da die Versuchstiere oft an bakteriellen Infektionen erkrankten, war das Zusammentreffen von Infektion und Abstoßung häufig. In acht Fällen fand sich eine Abstoßungsreaktion bei gleichzeitig vorhandener bakterieller Infektion.

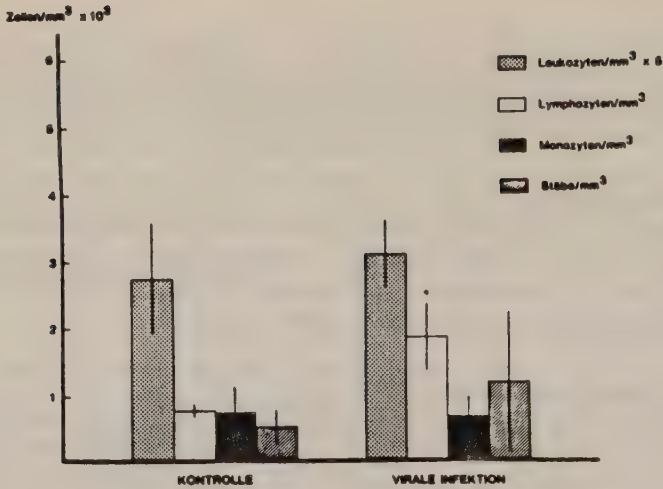


Abb. 27

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten vor und während viraler Infektion (n=5)

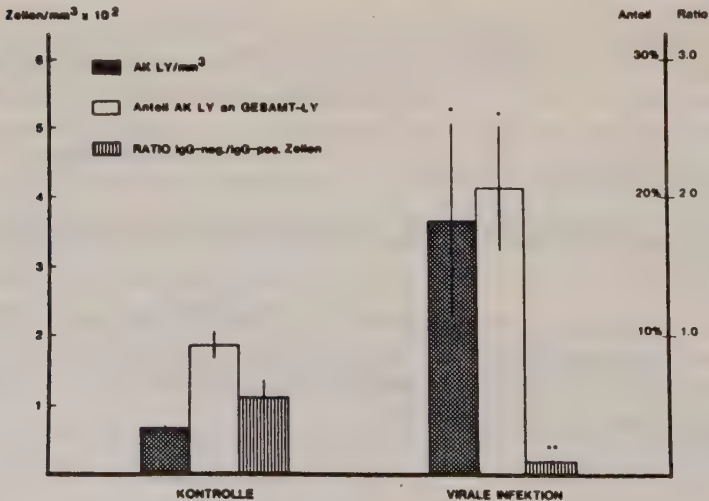


Abb. 28

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ vor und während viraler Infektion (n=5)

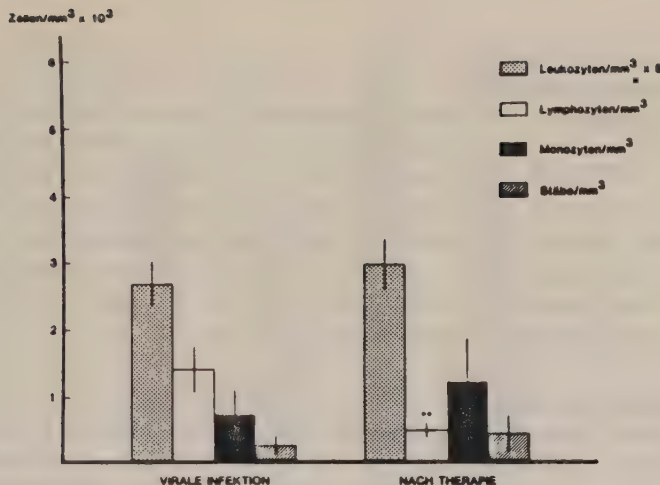


Abb. 29

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten während viraler Infektion und nach symptomatischer Therapie (n=4)

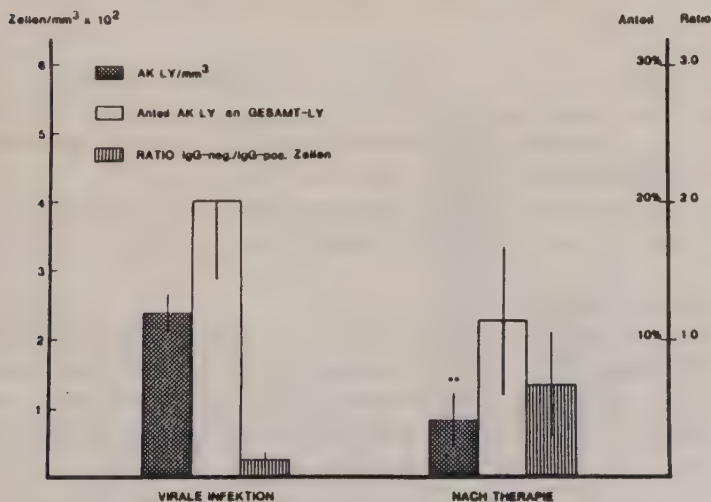


Abb. 30

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ während viraler Infektion und nach symptomatischer Therapie (n=4)

Das periphere Blutbild.

Die Ausgangswerte zeigten die in Kapitel 3.1.3 beschriebenen typischen Veränderungen für eine bakterielle Infektion: Leukozytose und Linksverschiebung. Durch die zusätzliche Reaktion des Empfängers auf das Transplantat erfolgte eine statistisch gesicherte Steigerung der Leukozyten/mm³ ($p \leq 0,0025$), während die Monozyten/mm³ nahezu unverändert blieben. Der zu erwartende Anstieg der Lymphozyten/mm³ fiel mit 64 % nicht signifikant aus (Abb. 31). Die stabkernigen Granulozyten wiesen dagegen eine statistisch gesicherte Steigerung von 71 % auf ($p \leq 0,05$).

Das mononukleäre Konzentrat.

Die zelluläre Abstoßung verursachte einen signifikanten Anstieg von aktivierten Lymphozyten/mm³ ($p \leq 0,0025$) bzw. deren prozentualen Anteil an den Gesamtlymphozyten ($p \leq 0,0025$). Das während bakterieller Infektion erniedrigte Verhältnis IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen/mm³ veränderte sich zu Gunsten der IgG-negativen Zellen ($p \leq 0,0025$) (Abb. 32).

3.1.8 Einfluß der Therapie auf bakterielle Infektion und zelluläre Abstoßung

Die Infektion wurde mit Antibiotika entsprechend dem Antibiogramm, die Abstoßung mit 3 - 5 Dosen von Methylprednisolon (250 mg i.v.) behandelt. Das Versuchstier X 2 konnte trotz hochdosierter Antibiotikatherapie nicht gerettet werden.

Die Veränderungen der Leukozyten und deren Subpopulation nach Therapie sind in Abb. 33 und 34 festgehalten.

Das periphere Blutbild

Die Zahl der Leukozyten/mm³ wie die der stabkernigen Granulozyten/mm³ verringerte sich bei Ansprechen der Antibiotikatherapie ($p \leq 0,05$). Die Wirkung von Methylprednisolon konnte anhand des signifikanten Abfalls der Lymphozyten/mm³ beobachtet werden ($p \leq 0,025$). Die Monozyten/mm³ blieben unverändert (Abb. 33).

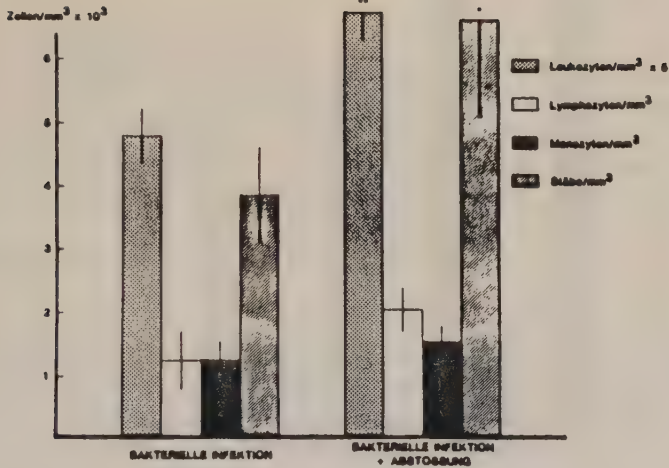


Abb. 31

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten vor und während zellulärer Abstoßung bei gleichzeitig bestehender bakterieller Infektion (n=8)

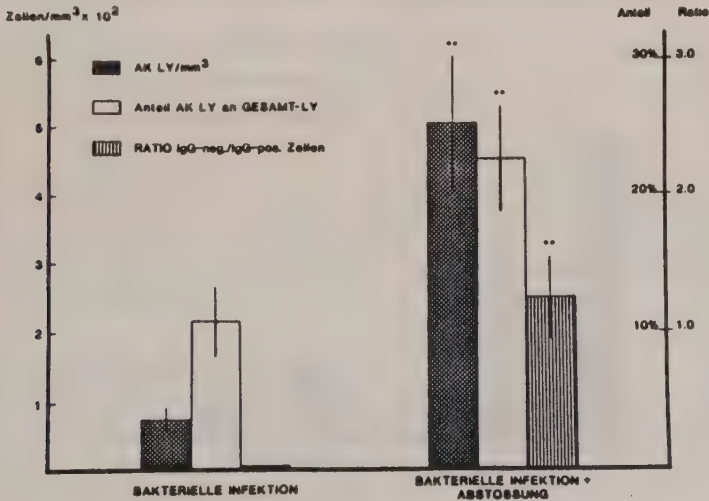


Abb. 32

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ vor und während zellulärer Abstoßung bei gleichzeitig bestehender bakterieller Infektion (n=8)

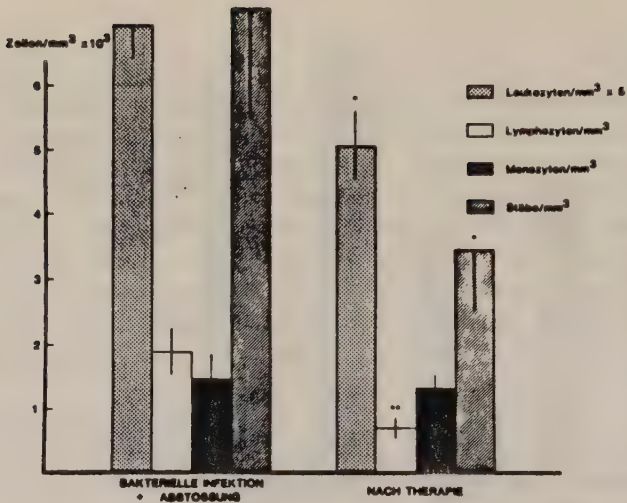


Abb. 33

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten während zellulärer Abstoßung und nach Therapie (Methylprednisolon, Antibiotika) bei gleichzeitig bestehender bakterieller Infektion (n=7)

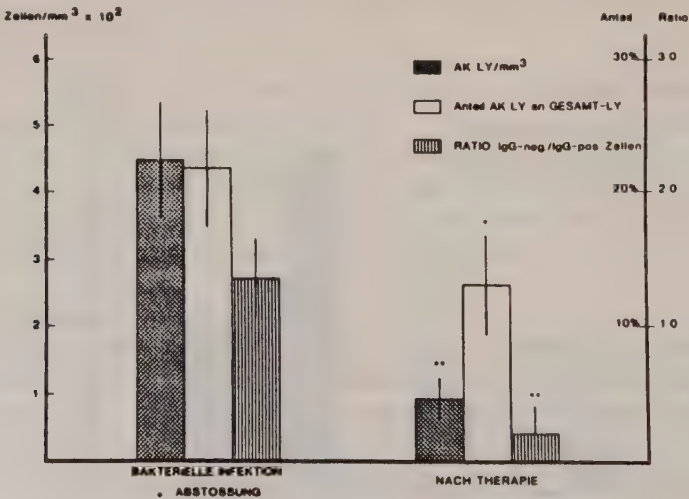


Abb. 34

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ während zellulärer Abstoßung und nach Therapie (Methylprednisolon, Antibiotika) bei gleichzeitig bestehender bakterieller Infektion (n=7)

Das mononukleäre Konzentrat.

War die eingesetzte Methylprednisolontherapie erfolgreich, nahm die Zahl der aktivierten Lymphozyten/mm³ ($p \leq 0,005$) sowie der Anteil dieser Zellen an den Gesamtlymphozyten ($p \leq 0,01$) signifikant ab. Das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen sank um 83 % ($p \leq 0,0025$) (Abb. 34).

Zusammenfassung:

Auch während einer bakteriellen Infektion sind die typischen Veränderungen der zellulären Abstoßung, wie die Blastogenese und der Anstieg der IgG-negativen Zellen, mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings zu erkennen (vgl. Kapitel 3.1.1). Die für die Abstoßung charakteristische Lymphozytose fehlt.

Alle Veränderungen sind nach Methylprednisolontherapie reversibel (vgl. Kapitel 3.1.2). Das Ansprechen der Antibiotikatherapie läßt sich am Abfall der Leukozyten und stabkernigen Granulozyten beobachten (vgl. Kapitel 3.1.4).

3.1.9 Die zelluläre Abstoßung im Verlauf einer viralen Infektion

Parallel zu bakteriellen Infektionen konnten auch während viraler Infektionen gleichzeitig auftretende zelluläre Transplantreaktionen beobachtet werden ($n = 4$).

Das periphere Blutbild.

Die Leukozyten/mm³ zeigten keine Veränderungen nach Auftreten einer zellulären Abstoßungsreaktion, während nicht signifikante Anstiege von Lymphozyten/mm³, Monozyten/mm³ und stabkernigen Granulozyten/mm³ zu verzeichnen waren (Abb. 35).

Das mononukleäre Konzentrat.

Die aktivierten Lymphozyten/mm³ sowie der Anteil dieser Zellen an den Gesamtlymphozyten/mm³ veränderten sich nur geringfügig. Das Verhältnis IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen stieg um 869 %.

($p = 0,05$) (Abb. 36).

3.1.10 Einfluß der Therapie auf virale Infektion und zelluläre Abstoßung.

Die Therapie der viralen Infektionen erfolgte symptomatisch mit Infusionen, Immunglobulinen und prophylaktischer Antibiotikagabe, die der Abstoßung mit Methylprednisolon (250 mg i.v.) über 3 - 5 Tage.

Die Abstoßungskrisen waren alle therapierefraktär. Das Tier A 6 dieser Gruppe verstarb an einer generalisierten Viruspneumonie.

Das periphere Blutbild.

Die Leukozyten/mm³ sanken um 28 %, die Lymphozyten/mm³ um 59 %, die Monozyten/mm³ um 23 % und die stabkernigen Granulozyten/mm³ um 30 % (Abb. 37). Allein der Abfall der Lymphozyten signalisierte ein Ansprechen der Therapie, wobei das Fehlen der Signifikanz auf die geringe Zahl von Wertepaaren zurückzuführen ist.

Das mononukleäre Konzentrat.

Alle drei Parameter des mononukleären Konzentrates wiesen nach Therapieende deutliche Veränderungen auf. Sowohl die Zahl der aktivierten Lymphozyten/mm³ als auch das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen sanken signifikant ab ($p \leq 0,05$). Der prozentuale Anteil aktivierter Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten des mononukleären Konzentrates verringerte sich um 23 % (nicht signifikant) (Abb. 38). Alle drei Parameter deuten somit auf einen Rückgang der Blastogenese hin.

Zusammenfassung:

Die Diagnose einer zellulären Transplantatreaktion während gleichzeitig verlaufender viraler Infektion stellt das größte Problem in der postoperativen Überwachung dar, da Abstoßung wie virale

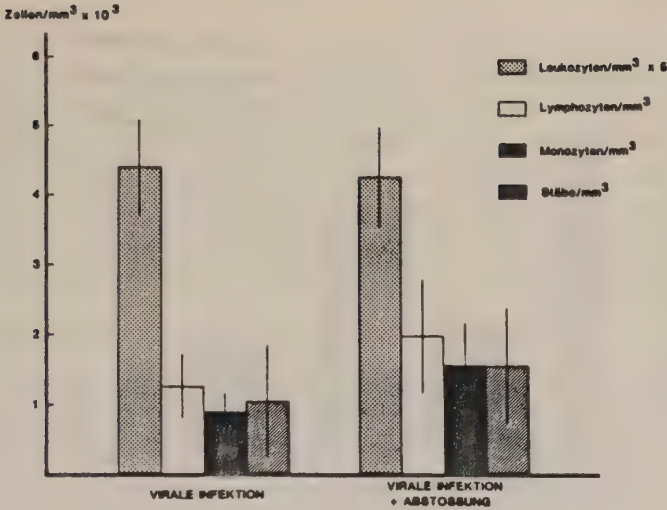


Abb. 35

Quantitative Veränderungen der Asolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten vor und während zellulärer Abstoßung bei gleichzeitig bestehender viraler Infektion (n=4)

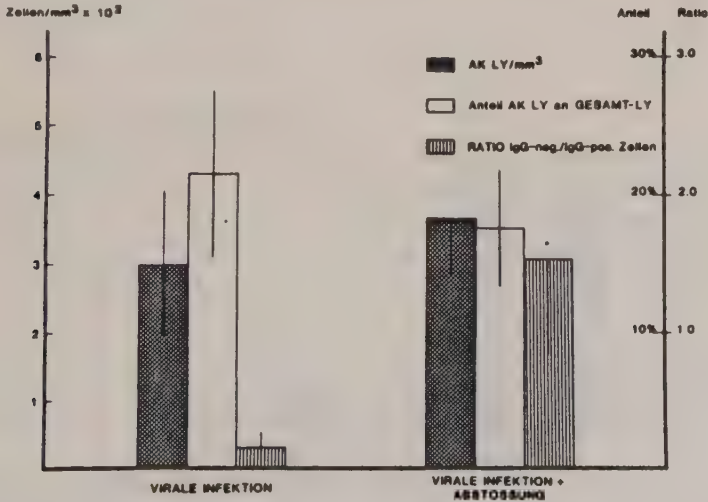


Abb. 36

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ vor und während zellulärer Abstoßung bei gleichzeitig bestehender viraler Infektion (n=4)

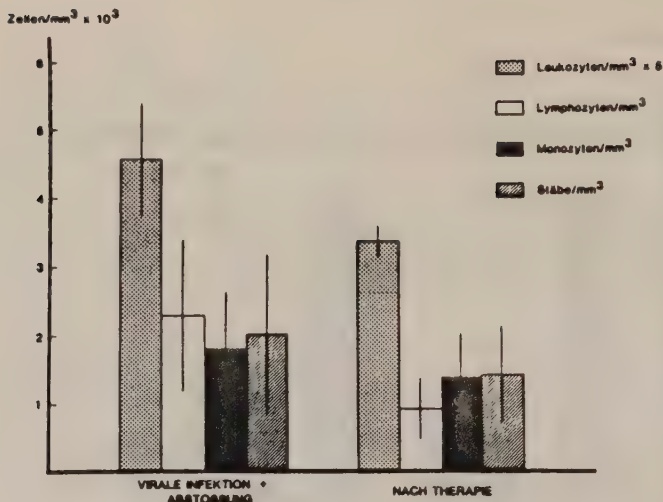


Abb. 37

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten während zellulärer Abstoßung und nach Therapie (Methylprednisolon) bei gleichzeitig bestehender viraler Infektion (n=3)

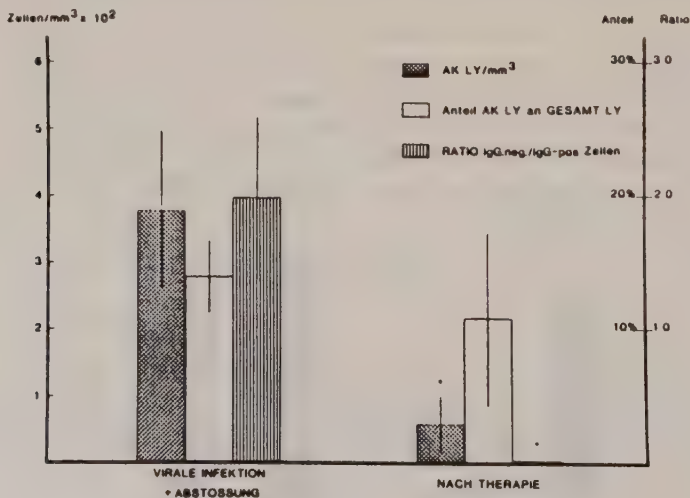


Abb. 38

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ während zellulärer Abstoßung und nach Therapie (Methylprednisolon) bei gleichzeitig bestehender viraler Infektion (n=3)

Infektion viele gemeinsame Parameter wie z.B. Lymphozytenproliferation oder Blastogenese besitzen. Lediglich das Verhältnis von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen erlaubt eine klare Differenzierung. Verließ die Transplantatreaktion über die T-Lymphozyten, sprich IgG-negativen Zellen, so waren in dieser Studie vor allem die B-Lymphozyten entsprechend den IgG-positiven Zellen für die Abwehr der viralen Infektion verantwortlich.

3.1.11 Die humorale Abstoßung.

Die humorale Transplantatreaktion stellt nach allogener Herztransplantation eine Rarität dar, während nach xenogener Herztransplantation mit einem gehäufteten Auftreten gerechnet werden muß. Bei drei Tieren konnte nach xenogener heterotoper Herztransplantation eine humorale Abstoßung ohne gleichzeitige Überlagerung von Infektionen diagnostiziert werden ($n = 3$).

Das periphere Blutbild.

Alle vier Parameter (Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, stabkernige Granulozyten) stiegen nach akutem Auftreten einer humoralen Abstoßung an, wobei sich nur die Lymphozytose als signifikant erwies ($p \leq 0,05$) (Abb. 39).

Das mononukleäre Konzentrat

Der Anstieg von aktivierten Lymphozyten/mm³ konnte statistisch gesichert werden ($p \leq 0,025$). Dementsprechend stieg ihr prozentualer Anteil an den Gesamtlymphozyten um 106 % ($p \leq 0,05$). Das Verhältnis IgG-negativer zu IgG-positiver Zellen/mm³ sank zugunsten der IgG-positiven Zellen signifikant ab ($p \leq 0,05$) (Abb. 40).

3.1.12 Einfluß der Methylprednisolontherapie nach humoraler Abstoßung.

In zwei von drei Fällen konnten durch den Einsatz von hochdosiertem Methylprednisolon eine vorübergehende Regression erzielt werden, die sich auch im zytoimmunologischen Monitoring beweisen ließ.

Das periphere Blutbild.

Nach Gabe von Methylprednisolon konnte ein Anstieg der Leukozyten/mm³ um durchschnittlich 50 % verzeichnet werden. Die Gesamtzahlen von Lymphozyten/mm³, Monozyten/mm³ und stabkernige Granulozyten verringerten sich dagegen (Abb. 41). Der Abfall der Lymphozyten nach Cortisontherapie fiel hierbei vergleichsweise geringer aus als bei der zellulären Abstoßung. Die Ursache hierfür könnte ein vermindertes Ansprechen der humoralen Abstoßung auf Methylprednisolon sein.

Das mononukleäre Konzentrat.

Im mononukleären Konzentrat gingen die aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. der prozentuale Anteil dieser Zellen an den Gesamtlymphozyten zurück. Die Unterschiede vor und nach Therapie sind beträchtlich. Statistisch zu sichern war der Anstieg des Verhältnisses von IgG-negativen zu IgG-positiven Zellen/mm³ ($p \leq 0,025$) (Abb. 42).

Zusammenfassung:

Die humorale Abstoßung äußert sich entsprechend der zellulären Abstoßung in einer Lymphozytose in Verbindung mit einer Blastogenese. Im Unterschied zur zellulären Abstoßung wird die humorale Transplantatreaktion durch die B-Lymphozyten vermittelt.

Die hier aufgeführten Veränderungen während humoraler Abstoßung entsprechen denen der viralen Infektion, so daß eine Differentialdiagnose "humorale Abstoßung und virale Infektion" mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings beim Hund nicht möglich erscheint.

Eine Normalisierung des mononukleären Konzentrates nach hochdosierter Kortisontherapie fällt bei der humoralen Abstoßungsreaktion deutlich geringer aus als bei der zellulären Abstoßungsreaktion.

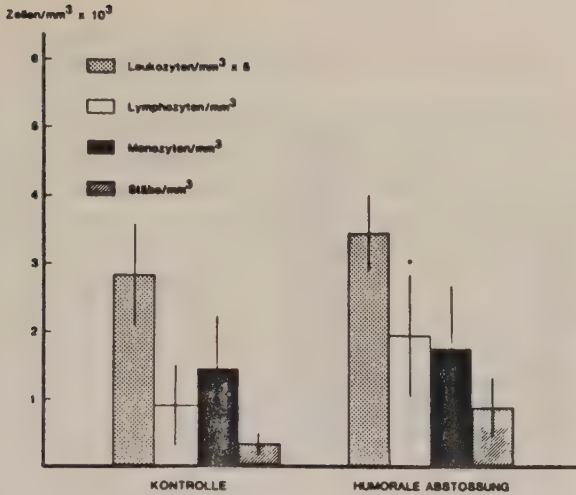


Abb. 39

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten vor und während humoraler Abstoßung (n=3)

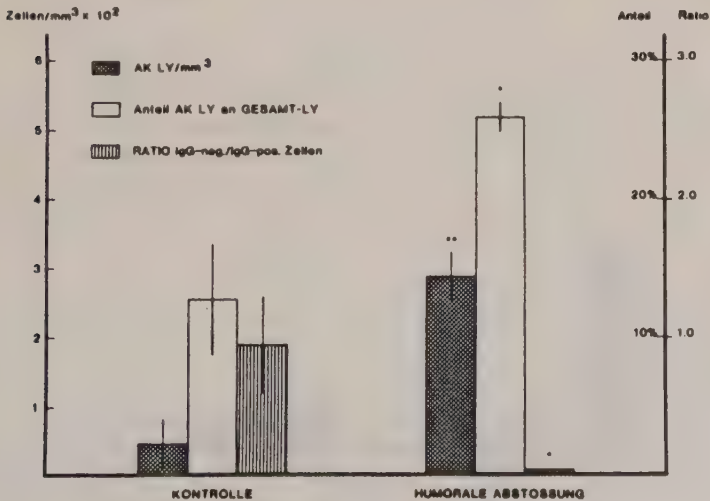


Abb. 40

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ vor und während humoraler Abstoßung (n=3)

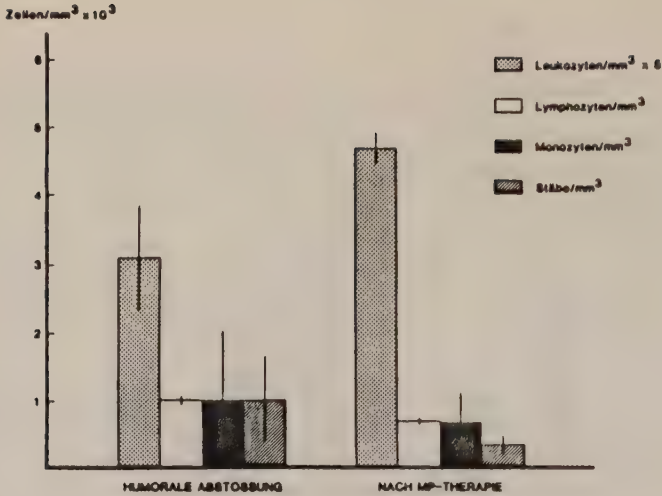


Abb. 41

Quantitative Veränderungen der Absolutzahlen/mm³ von Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und stabkernigen Granulozyten während humoraler Abstoßung und nach Methylprednisolontherapie (n=2)

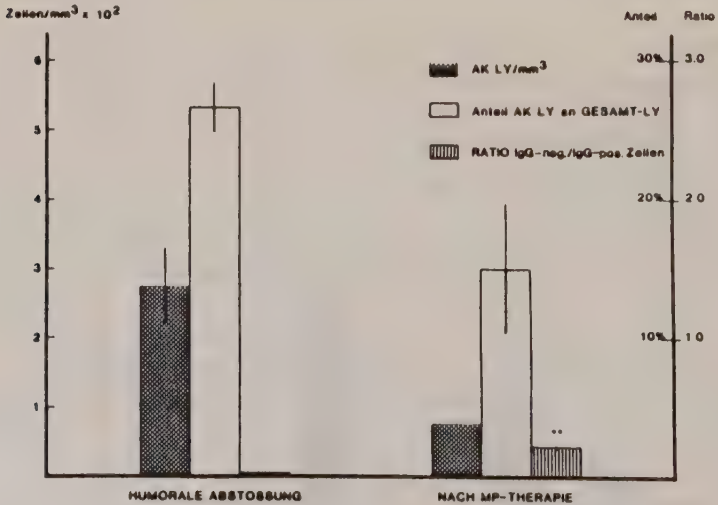


Abb. 42

Veränderungen von aktivierten Lymphozyten/mm³ bzw. IgG-negativen und IgG-positiven Zellen/mm³ während humoraler Abstoßung und nach Methylprednisolontherapie (n=2)

3.2. Veränderungen des Herzgewichtes nach Abstoßung.

Die durch die Transplantatreaktion verursachten Veränderungen des Herzmuskelgewebes, vor allem die Einlagerung von Gewebsflüssigkeit, waren die Ursache für eine signifikante Steigerung des Herzgewichtes (Tab. 7). Betrug der Zuwachs des Herzgewichtes nach Tod des Tieres und ohne gleichzeitige Transplantatreaktion 2,3 %, so stieg das Herzgewicht nach irreversibler Abstoßung (zellulär oder humoral) um 34,7 % an. Dieser Zuwachs des Herzgewichtes ist gemäß dem Student-t-Test signifikant ($p \leq 0,05$).

Bei den Tieren X 6 und X 8 wurde kein präoperatives, bei den Tieren A 4 und A 5 kein postmortales Herzgewicht bestimmt.

	Herzgewicht (g)		Steigerung des Herzgewichtes in %
	prä-op	postmortal	
I (n=6)	91,7 ± 13,1	93,9 ± 13,4	2,3
II (n=5)	78,2 ± 12,0	105,3 ± 23,8	34,7

Tab. 7

Veränderungen des Herzgewichtes nach Tod des Versuchstieres ohne Transplantatabstoßung (I) und mit irreversibler Transplantatabstoßung (II).

Gruppe 1: A 2, A 3, A 6, A 7, X 2, X 3; Gruppe 2: A 1, X 1, X 4, X 5, X 7)

3.3 Postoperative Überwachung mit und ohne Endomyokardbiopsie

Je drei Hunde aus der allogenen und der xenogenen Gruppe wurden postoperativ mit Hilfe der Endomyokardbiopsie überwacht. Diese Tiere bildeten die Gruppe 1 ($n = 6$). Bei drei weiteren Hunden jeder Gruppe erfolgte die postoperative Überwachung der Tiere nur mit dem zytoimmunologischen Monitoring (Gruppe 2; $n = 6$) (Tab. 8).

Hinsichtlich der Anzahl von Abstoßungskrisen pro Tier sowie dem prozentualen Anteil von Tagen mit diagnostizierter Abstoßung und damit verbundener Methylprednisolontherapie konnten zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 keine signifikanten Unterschiede errechnet werden. In Gruppe 2 fanden sich ein etwas geringer Anteil von Tagen mit diagnostizierter Abstoßung und somit auch weniger Behandlungstage mit hochdosierter Cortisongabe als in Gruppe 2.

Wesentlich bedeutender für die Wertigkeit des zytoimmunologischen Monitorings war die Frage, ob Tiere der Gruppe 2 ihr Transplantat durch eine akute Abstoßung verloren, ohne daß das Monitoring diese Reaktion erkannte. Diese Frage ist zu verneinen.

Sowohl in Gruppe 1 wie in Gruppe 2 traten Abstoßungsreaktionen auf, die durch das jeweilige postoperative Monitoring zwar erkannt und therapiert wurden, sich aber als therapieresistent erwiesen. Obwohl in Gruppe 1 die Endomyokardbiopsie zur Diagnose einer Transplantatreaktion eingesetzt wurde, konnte die irreversible Abstoßung von drei Herztransplantaten nicht verhindert werden. In Gruppe 2 waren zwei irreversible Transplantatreaktionen zu verzeichnen (Tab. 9).

Zusammenfassung:

Das zytoimmunologische Monitoring war in der Lage, die postoperative Verlaufskontrolle nach Herztransplantation ohne Fehldiagnose einer Abstoßungsreaktion (falsch negative Ergebnisse) zu übernehmen.

Gruppe	Anzahl von Abstoßungskrisen/Tier	prozentualer Anteil von Tagen mit Abstoßung an der Überlebenszeit	prozentualer Anteil von Tagen mit Cortisontherapie an der Überlebenszeit
1 EMB (n=6)	1,67	30,3% ± 9,1	25,8% ± 7,7
2 ZIM (n=6)	1,50	23,8% ± 5,8	17,7% ± 5,4

Tab. 8

Anzahl der Abstoßungskrisen pro Tier sowie der prozentuale Anteil von Tagen mit diagnostizierter Abstoßung und Cortisontherapie an der gesamten Überlebenszeit. (Gruppe 1: A 1, A 3, A 5, X 3, X 4, X 7) (Gruppe 2: A 2, A 4, A 7, X 1, X 2, X 5)

Gruppe	Nr.	Art der irreversiblen Abstoßung
Gruppe 1 EMB (n=6)	A 1 X 4 X 7	chronisch zellulär akut zellulär chronisch humoral
Gruppe 2 ZIM (n=6)	X 1 X 5	akut humoral akut humoral

Tab. 9

Häufigkeit und Art der irreversiblen Abstoßung in Gruppe 1 und Gruppe 2.

3.4 Vergleich zwischen zytoimmunologischem Monitoring und Endomyokardbiopsie

Bei den sechs Tieren der Gruppe 1 wurden insgesamt 13 Biopsien durchgeführt. Zusätzlich mußten zehn Autopsien (Gruppe 1 und Gruppe 2) vorgenommen werden. Abb. 43 zeigt den Vergleich der histologischen Ergebnisse mit dem parallel durchgeführten zytoimmunologischen Monitoring.

In 14 Fällen wies das histologische Präparat ein positives Ergebnis im Sinn einer Abstoßungsreaktion auf. Parallel hierzu war ohne vorherige Kenntnis der Histologie eine Aktivierung des zytoimmunologischen Zellbildes diagnostiziert worden. Falsch negative Ergebnisse, das heißt, ein nicht aktiviertes Zellbild bei positiver Histologie, trat nicht auf.

In drei Fällen ergab sich eine Aktivierung des Monitorings bei negativer Histologie. Diese falsch-positiven Ergebnisse sind auf Virusinfekte zurückzuführen, die eine ähnliche Aktivierung der Lymphozyten wie die Abstoßungsreaktion hervorrufen.

In einem falsch-positiven Fall konnte mit Hilfe des fluoreszierenden Antikörpers gegen IgG-tragende Zellen eine Abstoßung ausgeschlossen und die Diagnose eines Virusinfektes gestellt werden.

Legt man die statistischen Formeln der Vierfeldertafel zugrunde, ergab sich für das zytoimmunologische Monitoring eine Sensitivität von 100 %, eine Spezifität von 78 % und eine Vorhersagerichtigkeit von 91 %.

Zusammenfassung:

Vergleicht man Histologie und zytoimmunologisches Monitoring, ist das Monitoring ein hochsensitiver Test mit einer guten Vorhersagerichtigkeit für die Transplantatabstoßung.

ZYTOIMMUNOLOGISCHES MONITORING n = 23		
	positiv	negativ
HISTOLOGIE (EMB + Autopsie) n = 23	14	0
	2 $\frac{\lg G-}{\lg G+} > 1$	6
	1 $\frac{\lg G-}{\lg G+} < 1$	

Abb. 43
Gegenüberstellung von zytoimmunologischem Monitoring und Histologie (Endomyokardiopsie und Autopsie) in einer Vierfeldertafel

Teil C

DISKUSSION

Die Herztransplantation hat sich in den letzten Jahren als eine erfolgreiche und anerkannte Methode für angeborene und erworbene Herzfehler erwiesen (156, 173). Der ersten klinischen Herztransplantation im Dezember 1967 durch Christian Barnard (5) folgte in den nächsten Jahren ein sprunghafter Anstieg von weltweit durchgeführten Herztransplantationen. Nach Anfangserfolgen stellten die meisten Zentren ihr Transplantationsprogramm vorwiegend auf Grund immunologischer Probleme ein.

Erst die Einführung neuer immunsuppressiver Medikamente und verbesserter Techniken zur postoperativen Überwachung des Patienten lösten in den Jahren 1980 bis heute erneut einen Aufschwung in der klinischen Herztransplantation aus. Eine konsequente Forschungsarbeit und die Übertragung der erhaltenen Erkenntnisse in die Klinik führten zu einer deutlich verbesserten Überlebenschance für die Patienten (30, 137, 157).

Durch die steigende Zahl der durchgeführten Transplantationen ergaben sich zwangsläufig neue Probleme. Eines dieser bisher ungelösten Probleme war der erhöhte Bedarf an Organspendern. Durch die Verbesserung der Herzkonservierung konnte eine tolerable Ischämiezeit von 240 Minuten erreicht werden, was die Möglichkeit eröffnete, auch Spenderherzen aus auswärtigen Kliniken bis zu einer Entfernung von 1000 km zu verwenden (153).

Trotz dieses Fortschrittes ist die Zahl der Patienten, die auf der Warteliste versterben, mit durchschnittlich 26 % hoch (Tab. 10). Hauptursache ist die plötzliche irreversible Dekompensation des erkrankten Herzens.

Von dieser Statistik unberücksichtigt bleiben viele Patienten, die akut einen schweren Herzinfarkt erleiden oder nach Herzoperationen nicht von der Herzlungenmaschine zu entwöhnen sind. Für diese Patienten wäre die sofortige Verfügbarkeit eines Spenderherzens lebensrettend.

Die Praxis lehrt, daß humane Spenderherzen nur in Ausnahmefällen sofort verfügbar sind. Für die Zeit der Überbrückung, bis ein

Klinik	Letalität auf der Warteliste	Autor mit Referenzangabe
Department of Cardiovascular Surgery, Tuscon	16,7 %	Copeland (54), 1981
Department of Cardiovascular Surgery, Stanford	9,6 %	Pennoek (162), 1982
Papworth Hospital, Cambridge	39,0 %	Englisch (69), 1983
Texas Heart Institute, Houston	22,2 %	Cooley (51), 1983
La Pitie Hospital, Paris	42,0 %	Cabrol (31), 1983
Veterans Administration, Richmond	26,0 %	Szentpetery (188), 1983
Brigham and Women's Hospital, Boston	25,0 %	Collins (46), 1984
Papworth Hospital, Cambridge	32,0 %	Gory-Pearce (56), 1984
Montreal Heart Institute	23,0 %	Pelletier (161), 1984
Herzchirurgische Klinik Großhadern, München	24,1 %	Reichert (174), 1984
Durchschnittswert (n = 10)	26,0 %	

Tab.10
Übersicht über die Letalität von Patienten auf der Warteliste, die zur Herztransplantation anstehen

passendes Spenderherz gefunden ist, ergeben sich zwei Möglichkeiten:

- 1) Die Verwendung künstlicher Organe
- 2) Die Transplantation tierischer Gewebe

Diese Studie beschränkt sich auf die experimentelle Erforschung der xenogenen Herztransplantation. Ihr Ziel sollte sein, Aufschluß über die Möglichkeiten und Erfolgsaussichten einer klinischen xenogenen Herztransplantation zu erhalten.

1. Historischer Überblick

Erste wissenschaftliche Berichte über die Verpflanzung von Tierorganen auf den Menschen erschienen erstmals im 20. Jahrhundert.

Im Jahre 1905 beschrieb Princeteau (167) das Einlegen von Gewebstücken einer Kaninchenniere in die Niere eines Kindes mit terminaler Niereninsuffizienz.

Nach Berichten über erfolgreich durchgeführte xenogene Nierentransplantationen durch Reemtsma (170, 172) und Starzl (184), versuchten Hardy et al. (96) 1964 die erste xenogene orthotope Herztransplantation. Das Spenderherz stammte von einem Schimpansen. Zwei Stunden nach Eröffnung der Aorta und Beendigung des extrakorporalen Bypasses verstarb der Patient an einem Rechtsherzversagen. Das Schimpansenherz war zu klein, um den venösen Rückfluß zu bewältigen.

Weitere Versuche in dieser Richtung unternahmen Cooley 1968 (49), Barnard 1977 (6) und zuletzt Bailey 1984 (3), der das Herz eines Pavians in ein zwei Wochen altes Baby mit angeborenem Herzfehler implantierte.

Die kurzen Überlebenszeiten der Patienten machen klar, daß die Probleme der xenogenen Herztransplantation bisher nicht gelöst sind. Während die chirurgischen Schwierigkeiten beseitigt scheinen, liegt die Erforschung und Überwindung der immensen immunologischen Probleme in ihren Anfängen.

In der Vergangenheit wurden einige wenige tierexperimentelle Studien durchgeführt (Tab.11), die vor allem die Frage nach der besten immunsuppressiven Therapie nach xenogener Herztransplanta-

Autor (zit. Referenz)	Jahr	Spender	Empfänger (n)	Überlebens- zeit	Morphologie des transpl. Herzens
Donawick (64)	1971	Ziege	Kalb (6) (22)	5 Tage ^a	Mit ALS und Prednisolon behandelte Tiere ohne zelluläre Infiltrate
Regl (84, 85)	1971	Fuchs	Hund (5)	5,5 Tage ^a	anämische Nekrosen, Hyperämie
Cann (79)	1972	Fuchs	Hund (13)	8,4 Tage ^a	Humorale AB (2) Zelluläre AB (9) anämische Nekrosen (2)
Corry (55)	1974	Ratte	Maus (11)	5 Tage ^a	Myokardnekrose, Thrombose der Koronararterien, Infiltrate
Jeckel (112)	1974	Maus	Ratte	5 Tage ^a	Vaskulitis, Ödem, Myo- kardnekrosen
Kabita (113)	1975	Hamster	Ratte (15)	74,5 Std. ^a	Hämorrhagie, Thrombose der Koronararterien, Infiltrate
Humen (105)	1981	Hamster	Ratte (7) (30)	2 Tage ^a 10,5 Tage	Hämorrhagie, Ödem, Myo- kardnekrosen, Infiltrate
Hardy (97)	1982	Hamster	Ratte (7) (6)	2,9 Tage ^a 12,5 Tage	Hämorrhagie, Myokard- nekrosen, neutrophile Infiltrate
Shelby (179)	1982	Ratte	Maus (8) (9)	5 Tage ^a 7 Tage	Myokardnekrose, Infiltrate

^a ohne Immunsuppression

Tab. 11

Historische Übersicht über die bisher durchgeführten xenogenen Herztransplantationen im

tion klären sollten. Erwähnenswert sind die Arbeiten von Donawick (64), der mit einer Kombination von Prednisolon und ALG eine durchschnittliche Überlebenszeit von 20 Tagen erzielte. Über ähnliche Ergebnisse berichten Hardy et al. (97).

Homan (105) verwendet als erster Ciclosporin in einem xenogenen Tiermodell. Er untersuchte die Auswirkung einer unterschiedlichen Dosierung von Ciclosporin auf die Überlebenszeit xenogener Herztransplantate. Trotz der Anwesenheit von präformierten Antikörpern trat keine hyperakute Transplantatreaktion auf. Eine Ciclosporindosis von 35 mg/kg führte zu einer signifikanten Verlängerung der Funktionsdauer gegenüber Kontrollen und niedrigeren Dosierungen von 10 bzw. 25 mg/kg/KG.

2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

2.1 Die Versuchstiere:

Aufgrund der bisherigen Erfahrungen, die sowohl durch experimentelle als auch durch klinische Xenotransplantationen gewonnen wurden, erscheint die erfolgreiche Übertragung von Organen über die Speziesbarriere hinweg am ehesten innerhalb von zoologischen Familien möglich zu sein (125).

Für diese Studie wurde die Spezieskombination Fuchs-Hund verwendet. Beide Tiere gehören der selben zoologischen Familie an, d.h., die Kombination ist konkordant xenogen (32). Die Ähnlichkeit des Versuchsystems Fuchs-Hund zu Affe-Mensch, wie sie im folgenden dargestellt ist, erlaubte somit ein Protokoll, das möglicherweise auf die Klinik übertragbar ist.

Hinsichtlich der Histokompatibilität bestehen zwischen Fuchs und Hund (90) ähnlich wie zwischen Schimpanse-Mensch (32) nur geringfügige Unterschiede.

Gleiches gilt für die Erythrozytenantigene. Der Fuchs weist im Vergleich mit dem Hund zwei identische Antigene auf (90). Der Schimpanse besitzt ebenfalls zwei Blutgruppen (A und O), die mit denen des Menschen identisch sind (195).

Die Mehrzahl der Enzyme der Schimpansen konnten von denjenigen des Menschen elektrophoretisch nicht unterschieden werden (119). Gleiches zeigte Hammer et al. (90) auch für das System Fuchs-

Hund.

Auch in der Zahl der Chromosomen verhalten sich beide xenogenen Systeme ähnlich. Der Fuchs besitzt im Unterschied zum Hund (2 n=78) nur 34-40 Chromosomen (90), der Schimpanse eine dem Menschen (2 n=46) fast identische Chromosomenzahl von 2 n=48. Im genetischen Code spielt diese Tatsache keine Rolle. Beide Speziessysteme sind inkompatibel.

Das System Fuchs-Hund erwies sich für diese Studie günstig, weil der Hund als Empfängertier nicht die typischen Nebeneffekte des Ciclosporins aufweist, wie sie z.B. am Menschen beobachtet werden konnten (Nephrotoxizität, Hepatotoxizität) (17, 104). Die histologische Untersuchung von Niere, Leber, Pankreas und Milz der Versuchstiere bestätigt dies. Es konnten keine Ciclosporin-bedingten Schäden, wie z.B. vacuolisierte Tubuluszellen der Niere, gefunden werden.

2.2 Die Medikamente:

Die Wahl der immunsuppressiven Medikamente und deren Dosierung sollte klinikbezogen sein und dem neuesten Stand der pharmakologischen Forschung entsprechen. Diese Forderung wurde mit dem Einsatz von Ciclosporin erfüllt, das in den letzten 3-4 Jahren bei der postoperativen Behandlung von Transplantationspatienten erfolgreich angewendet wurde (34, 157). Ob Ciclosporin nach einer xenogenen Herztransplantation das implantierte Organ vor einer Abstoßung schützt, ist bisher ungeklärt, da die Wirkung von Ciclosporin auf die spezifische humorale Immunantwort nicht sicher erwiesen ist.

Keown et al. (117) sowie White et al. (193) bestreiten einen Effekt von Ciclosporin auf die Antikörperproduktion oder die Phagozytose. Sie gestehen Ciclosporin nur einen selektiven Effekt auf T-Lymphozyten zu.

Gordon et al. (81) zeigten mit Hilfe von Zellkolonien, daß Ciclosporin keine Wirkung auf die Myelopoese bzw. nur einen sehr geringen Effekt auf B-Lymphozyten-Kolonien besitzt. T-Lymphozyten-Kolonien waren dagegen hochsensitiv.

Da die Mehrzahl der Autoren der Ansicht ist, daß Ciclosporin

nicht nur einen selektiven Effekt auf T-Lymphozyten besitzt, sondern auch die B-Zell-Proliferation hemmt (22, 102, 108, 123, 124, 129, 190), wurde in dieser Studie Ciclosporin als immunsuppressives Medikament verwendet.

Als Parameter für Wirkung und Effekt von Ciclosporin auf xenogene Herztransplantate dienten die Funktionsdauer der implantierten Organe und deren histologische Untersuchung.

Klinische (103, 111, 183, 185) wie auch experimentelle (138) Untersuchungen zeigten, daß Ciclosporin für eine ausreichende Immunsuppression allein ungenügend und die Kombination mit anderen Immunsuppressiva erforderlich ist. Aus diesem Grund wurde eine Kombinationstherapie von Ciclosporin und Prednison verwendet. Die Dosierung von Prednison wurde gering gehalten. Ein großer Teil der Versuchstiere verstarb an Infektionen. Diese Anfälligkeit gegenüber Bakterien, Viren und Pilzen ist auf die Therapie mit Steroiden (76) zurückzuführen.

2.3 Überlebenszeit:

Gams et al. (78) führten bereits zu einem früheren Zeitpunkt allogene heterotope Herztransplantationen am Hund durch. Das zu transplantierende Herz wurde dem Empfängertier in den Hals implantiert, während in der vorliegenden Studie die intrathorakale heterotope Technik bevorzugt wurde. Trotz geringfügiger Unterschied beider Methoden erfolgt ein Vergleich beider Studien. Nach Gams betrug die durchschnittliche Funktionszeit allogenen transplantierten Herzen $6,8 \pm 0,8$ Tage ohne Immunsuppression, $10,5 \pm 1,5$ Tage ($p \leq 0,03$) mit Azathioprin und $16,0 \pm 3,6$ Tage ($p \leq 0,02$) mit Anti-Hunde-Lymphozytenserum (Tab. 12). Die vorliegende Studie erbrachte eine Überlebenszeit von $92,9 \pm 54,0$ Tage. Somit konnte mit Hilfe von Ciclosporin und einer niedrigen Dosis von Prednison eine Verlängerung der Funktionszeit um über 500 % erzielt werden.

Zwei Ursachen sind dafür verantwortlich:

1. Die Kombinationstherapie, die gegenüber der konventionellen Therapie eine verbesserte Immunsuppression mit sich bringt.
2. Das zytoimmunologische Monitoring, das frühzeitig eine Abstoßungsreaktion anzeigt.

Die Arbeitsgruppe Gams führte auch xenogene Herztransplantationen am Modell Fuchs-Hund durch (79, 84, 85). Die transplantierten Fuchsherzen schlugen im Durchschnitt $8,4 \pm 1,9$ Tage ohne Immunsuppression. Durch die Kombinationstherapie von Ciclosporin und Prednison konnte in dieser Studie eine Verlängerung der Funktionsdauer um 124 % auf $18,0 \pm 3,3$ Tage erreicht werden (Tab. 12).

Ähnliche Überlebenszeiten konnten nur Donawick (64) und Homan et al. (105) erzielen, der in einem System vergleichbare Verwandtschaft (Hamster-Ratte) unter Ciclosporintherapie eine durchschnittliche Funktionsdauer von 21 Tagen erzielten. Allerdings verwendete Homan eine auf den Menschen nicht übertragbare toxische Dosierung von Ciclosporin (35mg/kg/KG).

Die Anwendung von Antilymphozytenserum, TLI oder Azathioprin in Systemen mit vergleichbarem Verwandtschaftsgrad erbrachten vorwiegend schlechtere Überlebenszeiten (55, 64, 97).

	Autor	Immunsuppression	Funktions- dauer/Tage
Allogen	Gams	---	$6,8 \pm 0,8$
	Gams	Azathioprin	$10,5 \pm 1,5$
	Gams	Antilymphozytenserum	$16,0 \pm 3,6$
	Ertel	Cyclosporin A+Prednison	$92,9 \pm 54,0$
Xeno- gen	Gams	---	$8,4 \pm 1,9$
	Ertel	Cyclosporin A+Prednison	$18,0 \pm 3,3$

Tab. 12

Aufstellung der in der Vergangenheit durchgeführten heterotopen xenogenen Herztransplantationen im Modell Fuchs-Hund im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Studie

Hunde- bzw. Fuchs- Leukozyten-antigene wurden präoperativ nicht ausgetestet. Die Verteilung der Tiere erfolgte in dieser Studie zufällig. Aus diesem Grund könnte die überdurchschnittlich lange Überlebenszeit eines Hundes der xenogenen Gruppe (33 Tage) mit einer guten Übereinstimmung der Histokompatibilität zwischen Spender- und Empfängertier erklärt werden.

Bei präoperativem Ausschluß präformierter Antikörper im Empfängerserum und unter Berücksichtigung einer Übereinstimmung der Histokompatibilitätsantigene erscheint eine Verlängerung der Funktionsdauer transplanteder xenogener Herzen möglich.

2.4 Die Transplantatabstoßung:

Zelluläre wie humorale Mechanismen können eine Transplantatabstoßung verursachen. Während nach allogener Herztransplantation humorale Abstoßungskrisen selten vorkommen (86), findet man nach xenogener oder allogener Transplantation mit präoperativer Sensibilisierung ein gehäuftes Auftreten vor. Nach Meinung einiger Autoren (45, 91) hängt die Art der Transplantatreaktion nach xenogener Organverpflanzung von dem Verwandtschaftsgrad Spender-Empfänger ab. Nach Organübertragung zwischen Tieren verschiedener Ordnung (Schwein-Hund) bzw. verschiedener Familien (Katze-Hund) trat ein Organverlust nach Minuten bis wenigen Stunden auf (44, 165). Histologische Untersuchungen der abgestoßenen Organe entsprachen eindeutig den in Kapitel 2.5.2. definierten morphologischen Veränderungen nach humoraler Abstoßung.

Ähnliche morphologische Veränderungen konnten auch nach allogener Organtransplantation mit präoperativer Sensibilisierung des Empfängers gefunden werden (75, 150, 181).

Unterschiedliche Ergebnisse wurden nach xenogener Organtransplantation im nahverwandten System (Fuchs-Hund, Hamster-Ratte, Kaninchen-Hase) gefunden. Gams et al. (79) schrieben den Funktionsverlust xenogener Herztransplantate einer immunologisch bedingten Reaktion zu, die dem im allogenen System bekannten Typ der akuten zellulären Abstoßungsreaktion entspricht. Nur in zwei von 13 erfolgreichen Transplantationen wurde der frühzeitige Funktionsverlust im Sinne einer verzögerten hyperakuten humoralen Transplantatreaktion interpretiert. Erwähnenswert ist, daß diese beiden Tiere die kürzesten Überlebenszeiten aufwiesen.

Eindeutige Merkmale einer humoral verlaufenden Abstoßungsreaktion sowohl mit als auch ohne immunsuppressive Therapie beschrieben dagegen Kakita et al. (113), Corry et al. (55) und Dubernard (67).

Eine interessante Theorie stellte Donawick et al. (64) auf. Entsprechend der immunsuppressiven Therapie (Kontrolle, Prednison, ALS, ALS und Prednison) fand er unterschiedliche morphologische Veränderungen des Herzmuskels und differierende Überlebenszeiten zwischen 5 und 40 Tagen für xenogen-transplantierte Herzen. Eine Erklärung diese Phänomens konnte Donawick nicht liefern.

In dieser Studie konnten bei Versuchstieren mit xenogenen Herztransplantaten zelluläre und humorale Abstoßungskrisen sowie Übergangsformen diagnostiziert werden.

Versuchstiere, bei denen ausschließlich zelluläre Abstoßungskrisen diagnostiziert werden konnten, bzw. deren postoperativer Verlauf (Dauer und Häufigkeit der Abstoßungsreaktionen) dem von allogenen transplantierten Tieren ähnelte, erzielten gleiche Überlebenszeiten wie die Tiere aus der allogenen Gruppe. Versuchstiere mit humoraler Abstoßung wiesen deutlich erniedrigte Transplantatfunktionszeiten auf. Dies entspricht den Ergebnissen von Gams et al. (79).

Die humorale Abstoßungskrise konnte mit Methylprednisolon nicht therapiert werden und führte innerhalb weniger Tage zum Organverlust. Die durch die humorale Antwort ausgelösten vaskulären Gefäßveränderungen schienen hierbei der limitierende Faktor zu sein. Somit konnten Arbeiten von Flörsheim (73), Donawick (64) und Cerilli (41) bestätigt werden, die Kortikosteroiden nur einen geringen oder keinen Einfluß auf die humorale Abstoßungsreaktion einräumen.

Vergleiche von Transplantatfunktionsdauer mit dem Typ der Abstoßung lassen den Schluß zu, daß die Transplantatüberlebenszeit nicht nur, wie bisher behauptet, von dem Verwandtschaftsgrad Spender-Empfänger (164), sondern auch von der Art der Abstoßung abhängt.

Obwohl in dieser Studie keine Untersuchungen von Komplement oder Gerinnungsfaktoren durchgeführt wurden, ergeben sich allein an-

hand der pathologischen und immunologischen Befunde Hinweise dafür, daß während der humoralen Abstoßungskrise neben der spezifischen Abwehr (Antikörper) noch andere körpereigene unspezifische Systeme an der Zerstörung transplantierten Gewebes beteiligt sind (Abb. 44). Die Zerstörung der Gefäßwände (fibrinoide Nekrosen) lassen an eine Beteiligung des Komplementsystems denken. Neben dieser Destruktion der Gefäßwände fanden sich eine intravasale Verlegung der Gefäße und ischämische Nekrosen des Myokards. Ursache könnten Zellaggregate (Thrombozyten, Granulozyten) oder Gerinnungsthromben bei einem gesteigerten Gerinnungssystem sein (177).

Der Ablauf dieser unspezifischen Reaktionen ist wie folgt denkbar (Abb. 44):

An die spezifische immunologisch ausgerichtete Reaktion des Empfängertieres gegen das Xenotransplantat, schließt sich als sekundäres Phänomen eine unspezifische zelluläre Reaktion an. In erster Linie sind polymorphkernige Leukozyten und Thrombozyten beteiligt. Zahlreiche Autoren (64, 97, 113)) fanden polymorphkernige Leukozyten in xenogenen Transplantaten vor, während Lymphozyten nicht diagnostiziert werden konnten. Vergleichbare Befunde konnten in den histologischen Schnitten dieser Studie erhoben werden. Diese polymorphkernigen Leukozyten bilden Aggregate. Thrombozyten (vermutlich eine immunologisch wenig resistente Thrombozytenpopulation) werden dabei zum größten Teil zerstört. Dies würde auch die Thrombozytopenie erklären, die Gams et al. (79) kurz vor Verlust des transplantierten Organs fanden.

Aus diesen Vorgängen leiten sich weitere Faktoren ab, die zum zentralen pathophysiologischen Phänomen der humoralen Abstoßungsreaktion führen könnten: Dem unmittelbaren Anstieg des Strömungswiderstandes mit Abnahme des venösen Rückflusses und präkapillärer Stauung. Dies könnte die von vielen Autoren (97, 105, 113) beschriebenen Hämorrhagien verursachen, die auch in histologischen Schnitten dieser Studie gefunden wurden. Für dieses Zentralphänomen dürfte in erster Linie das Freiwerden von pharmakologischen Mediatorsubstanzen (=vasoaktive Substanzen), die bei der Antigen-Antikörper-Reaktion entstehen oder aus zerstörten Zellen (z.B. Thrombozyten) frei werden, verantwortlich seien.

Komplement scheint dabei an verschiedenen Stellen im Ablauf die-

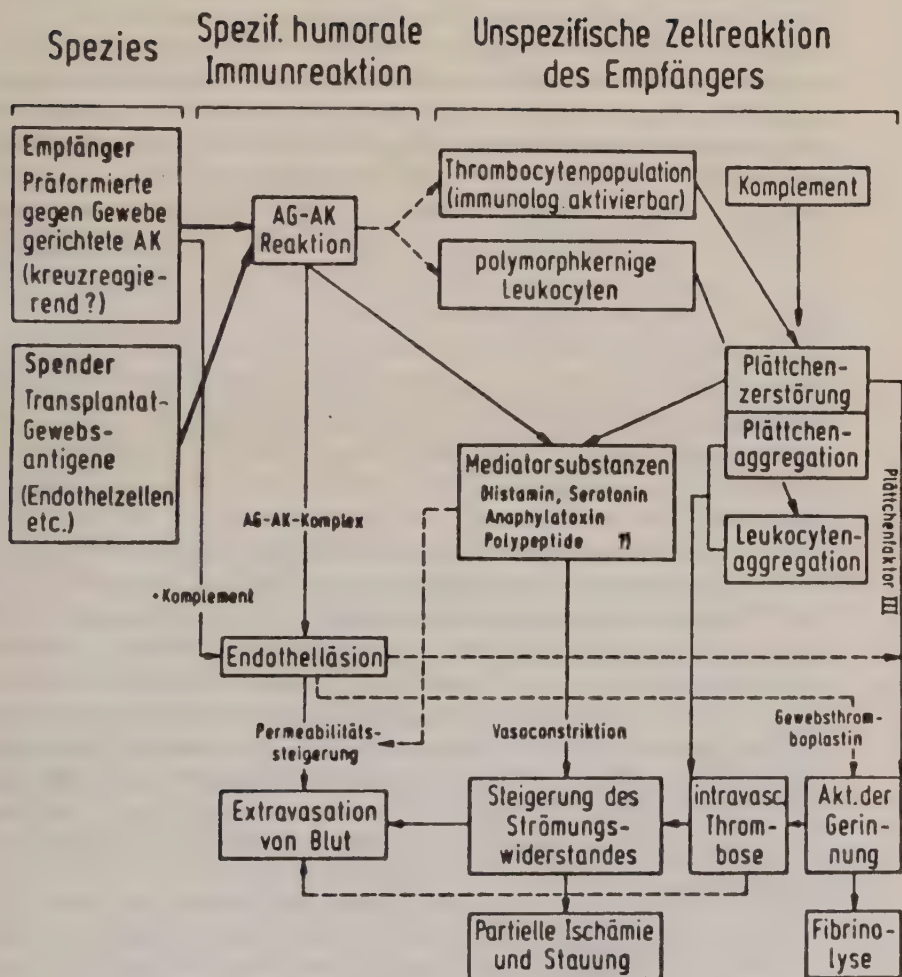


Abb. 44

Darstellung des möglichen Mechanismus der humoralen Abstoßungsreaktion

(aus: Möglichkeiten und Grenzen der xenogenen Organtransplantation, Springer-Verlag, Berlin, 1974, S. 42-43, 47)

ses Geschehens einzugreifen.

Dieser Mechanismus der humoralen Abstoßungsreaktion ist auf Grund der pathologischen Befunde aus dieser Studie denkbar. Unterstützt wird diese Theorie von einer Arbeit der Gruppe um Forbes (74).

Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluß zu, daß der Mechanismus der verzögert ablaufend humoralen Abstoßung nach xenogener Herztransplantation im nahverwandten System dem Mechanismus der hyperakuten allogenen Abstoßung nach präoperativer Sensibilisierung (74) oder dem Mechanismus der hyperakuten Abstoßung nach xenogener Transplantation im weit entfernten System (125, 128) verwandt ist. Das verzögerte Auftreten dieser humoralen Abstoßung liegt wahrscheinlich in der immunsuppressiven Therapie (Ciclosporin/Prednison) begründet.

Das Vorkommen humoraler neben zellulären bzw. gemischten Transplantatreaktionen ist proportional der Überlebenszeit der transplantierten Herzen. Mit humoralen Abstoßungskrisen korreliert werden konnte ein gehäuftes Auftreten von IgG-positiven Lymphozyten im peripheren Blut, die zum größten Teil B-Lymphozyten darstellen.

Da die Thrombosierung der Koronargefäße den limitierenden Faktor für eine Verlängerung der myokardialen Funktion darstellt, wurde den Versuchstieren neben immunsuppressiven Medikamenten der Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (Aspirin) verabreicht. Kemp et al. (114, 116), Green et al. (82) und Shons et al. (180) zeigten bei Anwendung eines Thrombozytenaggregationshemmers eine verlängerte Funktionsdauer xenogener Nierentransplantate. Ob letztlich ein nützlicher Effekt von Aspirin vorhanden war, läßt sich nicht beweisen, da auf eine Kontrollgruppe ohne Aspirin wegen mangels an Spendertieren verzichtet wurde.

3. Schlußfolgerungen:

Zusammenfassend läßt sich festhalten:

Ciclosporin ist in der Lage, auch über eine Inkompatibilitätsbarriere hinweg positiv auf die Überlebenszeit xenogener Herztransplantate in einem nahverwandten Spender- Empfänger-System einzu-

wirken. Den Wirkungen von Ciclosporin sind durch die zufällige Übereinstimmung der Histokompatibilität Grenzen gesetzt.

Histologisch fanden sich unter einer Ciclosporin-Predison-Therapie alle Formen der Abstoßung. Zelluläre Abstoßungskrisen ließen sich erfolgreich mit Methylprednisolon behandeln, während sich humorale Transplantreaktionen als therapieresistent erwiesen und zum Verlust des Organs führten. Während humoraler Abstoßung erfolgte vornehmlich ein Anstieg der IgG positiven Leukozyten und eine der zellulären Abstoßungsreaktionen parallel verlaufende Aktivierung des mononukleären Konzentrates. Histologische Schnitte wiesen geringe Infiltrate polymorphkerniger Leukozyten und keine Lymphozyteninfiltrate auf.

4. Ausblick:

Die Ergebnisse der bisher klinisch durchgeführten Transplantationen xenogener Organe und die Resultate dieser Studie rechtfertigen die Frage nach einem möglichen Einsatz der xenogenen Organübertragung in der klinischen Praxis.

Auf dem Sektor der Herztransplantation werden Spender rasch und oftmals unerwartet benötigt (akuter schwerer Herzinfarkt). In diesen Fällen der akuten Herzdekompensation könnte durch eine sofort durchgeführte Herztransplantation das Leben des Patienten gerettet werden. Diesem Eingriff sind Grenzen gesetzt, da ein Spenderherz selten sofort verfügbar ist.

Außerdem besteht eine große Diskrepanz zwischen Spenderangebot und Spenderbedarf trotz verbesserter Konservierungstechniken und der Möglichkeit der Fernexplantation (72, 153). Diese Lücken könnten eventuell durch den Einsatz eines xenogenen Herztransplantates oder des Kunstherzens geschlossen werden. Der große Vorteil des xenogenen Herztransplantates liegt in seiner physiologischen und biochemischen Anpassung an den Empfängerorganismus. Bei Verwendung eines Kunstherzens bleibt das Immunsystem unbeeinflusst. Beide Techniken fanden in der Vergangenheit ihre Anwendung (25, 48, 50, 190). Die kurzen Überlebenszeiten der Patienten rechtfertigen allerdings nicht den klinischen Einsatz von xenogenen Organtransplantaten oder die Verwendung des Kunstherzens als Dauerersatz für ein humanes Herz.

Nimmt man die kürzeste Funktionsdauer (10 Tage) eines Fuchsherzens in dieser Studie als Maßstab, so bietet sich die xenogene Herztransplantation bei akuter Herzdekompensation als vorübergehende Lösung an, bis ein humanes Spenderherz gefunden ist.

5. Zytoimmunologisches Monitoring - Historischer Überblick

Nach einer erfolgreich durchgeführten Herztransplantation kommt der Transplantatabstoßung die größte Bedeutung zu. In Abhängigkeit von der Natur des Antigens kommt es zur Sensibilisierung des Empfängerorganismus. Dieser Immunisierung folgt eine Proliferation von Lymphozyten in den Lymphknoten. Die Lymphozyten gelangen 3-4 Tage später über die Lymphwege in das Blut. Auf dem Blutweg wandern die Zellen in das Transplantat ein und zerstören das Spendergewebe. Diese immunologische Reaktion des Empfängers wird als Transplantatabstoßung bezeichnet (86, 87, 88).

Die frühzeitige Diagnose der Abstoßungsreaktion ist eines der vordringlichsten Ziele der Forschung auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie. Sie läßt sich am ehesten durch die tägliche Überwachung des Immunstatus des transplantierten Patienten erzielen.

In der Vergangenheit wurden für die postoperative Überwachung des Patienten eine Vielzahl von Verfahren entwickelt.

Das erste Monitoring war klinischer Natur. Lower et al. (133) beschrieben erstmals die Veränderungen des Elektrokardiogramms während einer akuten Transplantatabstoßung. Andere Gruppen verbesserten diese Technik, indem sie die EKG-Voltage berechneten (59, 118). Damit konnte auf Kosten eines erhöhten Zeitaufwandes eine Sensitivität von 72 % erzielt werden.

Im Jahr 1972 entwickelte die Arbeitsgruppe um Caves et al. eine Endomyokardbiopsiezange (35, 40). Diese Instrument ermöglicht es dem Kliniker, 2-4mm große Stückchen von Herzmuskelgewebe (Endo- bzw. Myokard) aus dem transplantierten Herzen zu entnehmen (13). Dabei wird die Biopsiezange nach perkutanter Punktion der Vena jugularis interna über die Vena cava superior und den rechten Vorhof in die rechte Herzkammer vorgeschoben (39). Nach erfolgreicher Anwendung im Tierversuch (35) konnte diese Technik

auf die Klinik übertragen werden (36, 38). Die Endomyokardbiopsie gilt bis heute als die Methode der Wahl zur Erkennung von Transplantatreaktionen am Herzen. Sie gibt Aufschluß über den Schweregrad der Abstoßung und das Ansprechen der immunsuppressiven Therapie während einer Abstoßungskrise.

Für nichtinvasive Methoden zur Früherkennung einer Transplantatreaktion bot sich die Immunologie mit ihren technischen Verfahren an. Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Tests erlangte nur der Rosettentest klinische Bedeutung.

1970 beschrieben Coombs et al. (52) eine neue Methode, wonach Erythrozyten vom Schaf in einem hohen Prozentsatz mit menschlichen Lymphozyten sogenannte "Rosetten" formten. Hierbei handelt es sich um eine ringförmige Anlagerung der Schafserythrozyten an bestimmte Lymphozyten. Brain et al. (24) bestätigten diese Entdeckung und fanden heraus, daß die Zahl der rosettenbildenden Lymphozyten gut mit dem Effekt der immunsuppressiven Therapie korreliert. Zahlreiche Arbeitsgruppen (130, 189) benutzten diese Technik als postoperatives Monitoring. Im allgemeinen konnte eine gute Korrelation zwischen Auftreten der Abstoßung und Anstieg von rosettenpositiven Lymphozyten beobachtet werden. Speziell unter ATG-Therapie fand sich eine signifikante Erniedrigung der rosettenbildenden Lymphozyten. Der Rosettentest ist eine einfach durchzuführende und reproduzierbare Methode, die eine gute Sensitivität und Vorhersagerichtigkeit aufweist.

Auch biochemische Verfahren fanden in jüngster Zeit ihre Anwendung als postoperatives Monitoring.

Womble et al. (196) untersuchten bei herztransplantierten Patienten den Polyaminspiegel im Urin. Sie verzeichneten bei Auftreten einer akuten Abstoßung eine Erhöhung des Polyaminspiegels bereits 1-3 Tage vor einer positiven Endomyokardbiopsie. Da unter Ciclosporintherapie dieser Parameter seine Aussagefähigkeit verlor, wurde der Test korrigiert und die Veränderungen von Abbauprodukten der Polyamine analysiert. Erneut zeigte sich eine gute Beziehung zwischen Veränderungen dieser Komponenten und dem Auftreten einer Abstoßung. Eine signifikante Übereinstimmung konnte nicht erzielt werden. Falsch positive Ergebnisse traten bei Sepsis, Lymphomen oder nach Operationen auf (196).

6. Diskussion des zytoimmunologischen Monitorings:

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines postoperativen Monitorings auf immunologischer Basis. Aus der Vielzahl der in der Vergangenheit beschriebenen Testverfahren wurden einige Methoden aufgegriffen, verbessert und zu einer neuen Testkombination vereinigt. Dieser Test erhielt die Bezeichnung "zytoimmunologisches Monitoring".

Das zytoimmunologische Monitoring setzt sich aus 3 Verfahren zusammen:

1. Der Separation von mononukleären Zellen, wie sie zum ersten Mal von Boyum (23) beschrieben wurde.
2. Der zytologischen Differenzierung von Lymphozyten und ihren unreifen bzw. reifen Formen. Diese Differenzierung von Lymphozyten ist in der Hämatologie ein Routineverfahren, um Erkrankungen des Blutes zu diagnostizieren. Zur Früherkennung von Herztransplantatabstoßungen sind zytologische Tests in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Allerdings untersuchten einige Arbeitsgruppen (37, 63, 147) die Proliferation von Lymphozyten mit Hilfe anderer Methoden. Nach Stimulation mit einem Antigen ("Reaktive Lymphozytenblastogenese") wurde die Aufnahme von H^3 -Thymidin durch periphere Lymphozyten gemessen (63).
3. Der Differenzierung von Subpopulationen der Lymphozyten mit fluoreszierenden Antikörpern. Diese Technik geht auf das Jahr 1961 zurück. Möller et al. (144) beschrieben zum ersten Mal die Technik der direkten Immunfluoreszenz. Raff et al. (168, 169) stellten an Mäusen fest, daß sich IgG-positive Zellen aus Milz, Lymphknoten, Thymus und Duktus thoracicus in unterschiedlichen Prozentzahlen fluoreszenzpositiv darstellen. Morphologische Untersuchungen wiesen diese Zellen als Lymphozyten aus.

Für das zytoimmunologische Monitoring wurde ein fluoreszierender Antikörper gegen IgG tragende Zellen verwendet. Bisher gibt es in der Literatur keine eindeutige Antwort auf die Frage, welche Subpopulationen der Leukozyten mit einem Antikörper gegen Immunglobuline markiert werden können. Einige Arbeitsgruppen (7, 8, 62, 168, 192) gestehen nur B-Lymphozyten Immunglobuline zu,

die an der Oberfläche der Zellen gebunden sind. Bankhurst et al. und andere Forschungsgruppen (4, 135, 197) beschrieben Immunglobuline nicht nur auf der Oberfläche von B-Lymphozyten sondern auch auf T-Lymphozyten. Diese T-Lymphozyten fielen durch ihre Zellgröße und Morphologie auf. Bankhurst vermutete, daß diese T-Lymphozyten aktivierte Lymphozyten bzw. Lymphoblasten sind. Als erwiesen gilt, daß B-Lymphozyten an ihrer Oberfläche eine höhere Dichte von Immunglobulinen tragen als T-Lymphozyten.

Preud'Homme et al. (166) sowie Kumagai et al. (121) stellten fest, daß auch Monozyten bzw. Makrophagen (10) durch fluoreszierendes Immunglobulin G markiert werden können.

Es besteht Einigkeit bei allen Autoren darüber, daß auf dem B-Lymphozyten Oberflächenimmunglobuline insbesondere vom Typ G vorhanden sind. Ob auch Monozyten, Makrophagen oder aktivierte T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche solche Immunglobuline besitzen, ist weiterhin unklar.

Deshalb wird in dieser Studie nicht von IgG-positiven B-Lymphozyten und IgG- negativen T-Lymphozyten, sondern nur ganz allgemein von IgG- positiven bzw. IgG- negativen Zellen gesprochen.

6.1 Durchführung des zytoimmunologischen Monitorings

6.1.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial wurde Blut verwendet. Die Abnahme des Blutes ist für den Patienten nicht belastend und ohne jedes Risiko. Hierin besteht einer der Vorteile des zytoimmunologischen Monitorings gegenüber der Endomyokardbiopsie. Diese Technik ist invasiv und für den Patienten ein unangenehmer Eingriff (71). Wegen der Invasivität ist die Endomyokardbiopsie nur in größeren Zeitabständen durchführbar und gestattet nicht immer eine lückenlose postoperative Überwachung des herztransplantierten Patienten.

Für das zytoimmunologische Monitoring wird nur eine geringe Menge Blut (5 ml) pro Test benötigt. Eine tägliche Durchführung ist über Monate hinweg möglich und der Kliniker erhält einen lückenlosen Verlauf des täglichen Immunstatus des Patienten. Weist das zytoimmunologische Monitoring auf eine Abstoßung hin, kann zur Diagnosesicherung ein zweiter Test am gleichen Tag durchgeführt

werden. Bei erhöhtem Verdacht auf eine Transplantatabstoßung sollte zur endgültigen Diagnosestellung eine Endomyokardbiopsie durchgeführt werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Studie fällt auf, daß bereits 2-3 Tage vor einer positiven Endomyokardbiopsie das zytoimmunologische Monitoring Hinweise auf eine Abstoßung lieferte. Es erkennt somit eine Abstoßung frühzeitiger als die Biopsie. Die Gefahr einer irreversiblen Zerstörung von Myozyten durch eine fortgeschrittene Abstoßungskrise wird verringert.

6.1.2 Zeitaufwand und Fehlerquellen:

Für die Durchführung des zytoimmunologischen Monitorings einschließlich der Auswertung des zytologischen Teiles wurden 30 Minuten benötigt. Die Inkubation mononukleärer Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern und deren Differenzierung nimmt weitere 45 Minuten in Anspruch. Durch Vereinfachung der Zellseparation und den Einsatz einer Schnellfärbung konnte der Arbeitsaufwand des zytoimmunologischen Monitorings von dem Erhalt der Blutprobe bis zur vorläufigen Diagnosestellung auf 15 Minuten verkürzt werden (70).

Das zytoimmunologische Monitoring ist schnell und mit einfachen Mitteln durchführbar. Der Personalaufwand ist gering. Methodische Fehlerquellen sind kaum vorhanden. Hierin zeigt das zytoimmunologische Monitoring seinen Vorteil gegenüber anderen immunologischen Testverfahren.

Die Messung der durch Lymphozyten hervorgerufenen Zytotoxizität ("Lymphocyte-mediated-cytotoxicity=LMC") bietet eine ausreichende Sensitivität. (2, 77, 186). Die für diesen Test benötigte Inkubationszeit schwankt zwischen 4 und 16 Stunden. Allerdings erbringt nur eine Inkubationszeit von 16 Stunden eine dem zytoimmunologischen Monitoring vergleichbare Sensitivität (66). Ein solches Testverfahren mit einem Zeitaufwand von 16 Stunden ist zur Früherkennung von Abstoßungsreaktionen ungeeignet.

Auch Isotopenuntersuchungen, wie die Messung des H^3 -Thymidin-Einbaus in unstimulierte Lymphozyten (37, 77, 147) sind auf Grund der langen Inkubationszeiten dem zytoimmunologischen Monitoring unterlegen.

6.1.3 Anwendungsbereich:

Viele Verfahren zur Erkennung einer Transplantatabstoßung sind von dem Typ des immunsuppressiven Medikamentes abhängig. Dies trifft vor allem für klinische, zum Teil auch für immunologische Techniken zu.

Unter einer Therapie mit Ciclosporin verlor das EKG als diagnostischer Parameter mit einer Sensitivität von 37 % seine Bedeutung (59, 60, 118).

Ähnlich verhält es sich mit dem Rosettentest (130, 189). Diese Methode bietet eine gute Kombination zwischen auftretender Abstoßung und dem Anstieg von rosettenpositiven Lymphozyten unter ATG-Therapie. Unter einer immunsuppressiven Medikation mit Ciclosporin (57) können mit dem Rosettentest keine Aufschlüsse über eine Abstoßungskrise erhalten werden.

Das zytoimmunologische Monitoring ist nicht therapieabhängig. Die Ergebnisse dieser Studie weisen daraufhin, daß unter einer Kombinatinstherapie von Ciclosporin und Prednison Abstoßungskrisen frühzeitig erkannt werden. Gleiches gilt für eine Kombination von Ciclosporin mit Azathioprin und für ATG (unveröffentlichte Daten).

Anzumerken bleibt, daß Dawkins et al. (59) in jüngster Zeit ein klinisches Verfahren beschrieben, das unter Ciclosporintherapie eine dem zytoimmunologischen Monitoring vergleichbare Wertigkeit (Sensitivität 87 %, Spezifität 90 %, Vorhersagerichtigkeit 83 %) aufweist. Mit Hilfe der Echophonokardiographie wurde die diastolische Funktion des transplantierten Herzens untersucht. Es fand sich eine gute Korrelation zwischen isovolumetrischer Entspannungszeit und Transplantatabstoßung.

6.2 Differentialdiagnose Abstoßung-Infektion:

Die Differentialdiagnose zwischen Abstoßung und Infektion stellt das größte Problem für ein postoperatives Monitoring dar, da sowohl Transplantationsantigene als auch Viren oder Bakterien eine Aktivierung des menschlichen Immunsystems hervorrufen.

Faßt man die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse zusammen (Tab. 13-15), weist das zytoimmunologische Monitoring Unterschiede zwischen Abstoßung, bakterieller und viraler Infektion auf.

Die zelluläre Transplantatreaktion zeichnet sich durch eine Leukozytose ($p \leq 0,05$) in Verbindung mit einer Lymphozytenproliferation ($p \leq 0,025$) aus. Letztere wird durch einen hochsignifikanten Anstieg von aktivierten Lymphozyten (Prälymphoblasten) und Lymphoblasten ($p \leq 0,025$) im mononukleären Konzentrat deutlich (Tab. 13). Prälymphoblasten bzw. Lymphoblasten sind lymphoide Zellen, die bei nichttransplantierten gesunden Hunden nur in geringer Zahl im mononukleären Konzentrat zu finden sind. Deshalb konnte ein Zellbild eines gesunden Hundes von dem eines transplantierten Hundes während einer akuten Abstoßung abgegrenzt werden. Für ein mit Prälymphoblasten und Lymphoblasten angereichertes mononukleäres Konzentrat wurde der Begriff des "aktivierten mononukleären Konzentrates" eingeführt.

Die zelluläre Abstoßung zeichnet sich außerdem durch einen deutlichen Anstieg der IgG negativen Zellen aus ($p \leq 0,01$).

Die Differenzialdiagnose zwischen bakterieller Infektion und zellulärer Abstoßung kann mit Hilfe des peripheren Blutes gestellt werden. Die bakterielle Infektion weist keine Lymphozytose auf. Stattdessen tritt eine Linksverschiebung, d.h. eine erhöhte Anzahl von stabkernigen Granulozyten und juvenilen Zellen auf. Im mononukleären Konzentrat fehlen Prä- und Lymphoblasten. Die Zahl der IgG-negativen Zellen sinkt zugunsten der IgG-positiven Zellen (Tab. 14). Diese Veränderungen entsprechen jenen, wie sie in der Literatur für die bakterielle Infektion beschrieben sind (176). Neben dem im Mikroskop sichtbaren Auftreten von Prä- und Lymphoblasten gab ein weiterer Parameter Aufschluß über die Lymphozytenproliferation: Der Anteil aktivierter Lymphozyten verglichen mit der Gesamtzahl der Lymphozyten im mononukleären Konzentrat. Bei einer zellulären Transplantatreaktion konnten signifikante Anstiege dieses Verhältnisses ($p \leq 0,005$) berechnet werden. Bei der bakteriellen Infektion war ein nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

Die Virusinfektion weist einige Parallelen zu der zellulären Abstoßung auf. Es findet sich eine Lymphozytose im peripheren Blutbild ($p \leq 0,05$) und ein Anstieg der Prä- und Lymphoblasten im mononukleären Konzentrat ($p \leq 0,05$) (Tab. 15).

Die Schwierigkeit der Differentialdiagnose zwischen zellulärer Abstoßung und viraler Infektion ist für viele Testverfahren der limitierende Faktor. Betroffen sind vor allem spenderspezifische Verfahren (77) und Techniken zur Messung der Blastogenese (136, 160, 187). Durch die Berechnung der Gesamtzahlen von IgG-negativen und IgG-positiven Zellen kann eine Differenzialdiagnose zwischen zellulärer Abstoßung und viraler Infektion erzielt werden. Steigen bei der Transplantatabstoßung die IgG-negativen Zellen an ($p \leq 0,01$), kommt es bei der viralen Infektion zu einem signifikanten Anstieg der IgG-positiven Zellen ($p \leq 0,025$).

Wie neueste Untersuchungen an Patientenblut zeigen, kann der fluoreszierende Antikörper gegen IgG tragende Zellen erfolgreich durch monoklonale Antikörper (122, 175) ersetzt werden (42, 47). Zusätzliche Hinweise auf eine virale Infektion gibt eine neue Subpopulation von Lymphozyten, die erst kürzlich beschriebenen "Large Granular Lymphocytes". Diese Zellen treten vor allem bei Virusinfektionen auf (70).

Das zytoimmunologische Monitoring ist in der Lage, mit Hilfe weniger Parameter zwischen Abstoßung, bakterieller und viraler Infektion zu unterscheiden. Im Gegensatz zu anderen Testverfahren ermöglicht es nicht nur die frühzeitige Diagnose einer Transplantatabstoßung, sondern gibt Hinweise auf das Vorhandensein einer bakteriellen oder viralen Infektion. Wie die klinische Praxis lehrt, treten die zytologischen Veränderungen bereits Tage vor den typischen klinischen Zeichen einer Infektion auf. Dem Kliniker bietet sich die Möglichkeit, frühzeitig mikrobiologische und serologische Untersuchungen zu veranlassen, um frühzeitig eine geeignete Therapie einzuleiten.

Wie die Ergebnisse dieser Studie weiterhin zeigen, kann auch bei gleichzeitigem Auftreten von Abstoßung und Infektion eine Unterscheidung erfolgen. Diese Differenzialdiagnose läßt sich mit den gleichen zytologischen Parametern erreichen. Zusatzuntersuchungen sind nicht erforderlich.

peripheres Blut	Lymphozytose
mononukleäres Konzentrat	Anstieg der Prä- und Lymphoblasten Anstieg der IgG- negativen Zellen

Tab.13

Typische Veränderungen der Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut und mononukleären Konzentrat während einer zellulären Abstoßung

peripheres Blut	Leukozytose Anstieg von stabkernigen und juvenilen Granulocyten
mononukleäres Konzentrat	Anstieg der IgG-positiven Zellen

Tab.14

Typische Veränderungen der Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut und mononukleären Konzentrat während einer bakteriellen Infektion

peripheres Blut	Lymphozytose
mononukleäres Konzentrat	Anstieg der Prä- und Lymphoblasten Anstieg der IgG- positiven Zellen

Tab.15

Typische Veränderungen der Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut und mononukleären Konzentrat während viraler Infektion

6.3 Die Wertigkeit des zytoimmunologischen Monitorings:

Um eine Überprüfung der Ergebnisse des zytoimmunologischen Monitorings zu erhalten, wurden 23 Endomyokardbiopsien mit den Ergebnissen von 23 parallel durchgeführten zytologischen Tests verglichen. Falsch negative Ergebnisse d.h. ein nicht aktiviertes mononukleäres Konzentrat bei positivem Biopsiebefund, trat nicht auf. Das zytoimmunologische Monitoring hatte keine Transplantatabstoßung übersehen. Dies ergibt eine Sensitivität von 100 %. Aus diesem Grund wird bei klinischer Anwendung des zytoimmunologischen Monitorings zuerst nur die Zytologie durchgeführt. Im Falle eines aktivierten mononukleären Konzentrates wird die Immunfluoreszenz herangezogen, um eine Differenzialdiagnose Abstoßungs-Infektion zu ermöglichen (70).

In drei Fällen erwies sich die Zytologie als falsch positiv. Dies ergibt eine Spezifität von 67 %. In einem von drei Fällen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz ein Hinweis auf eine virale Infektion gefunden werden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die Spezifität der Zytologie auf 78 % verbessert.

Das zytoimmunologische Monitoring mit einer Sensitivität von 100 %, einer Spezifität von 78 % und einer Vorhersagerichtigkeit von 91 % scheint vielen anderen Testverfahren gleichwertig oder überlegen zu sein. Nur das verbesserte echophonokardiographische Verfahren (59) zeigt eine vergleichbare Wertigkeit.

6.4 Nachteile des zytoimmunologischen Monitorings

Neben vielen positiven Aspekten weist das zytoimmunologische Monitoring Fehlerquellen auf, die noch gelöst werden müssen.

1. Blut ist ein Untersuchungsmaterial, das nur begrenzt haltbar ist. Muß das Blut über größere Entfernungen transportiert werden, sind auch bei kühler Lagerung nach 10-12 Stunden technische Probleme zu erwarten. Die Separation mononukleärer Zellen mit Hilfe des Fikoll-Hypaque-Gradienten ist unsauber. Dies kann unter Umständen zu schlechten Präparaten und damit verbundener Fehldiagnosen führen.
2. Eine Quantifizierung der Ergebnisse des zytoimmunologischen Monitorings, d.h. eine Einteilung in Abstoßungsgrade entsprechen der Zahl der aktivierten Lymphozyten, konnte nicht erreicht werden. Die Schwankungsbreite der Absolutzahlen von Tier zu Tier ist zu groß. Außerdem ist die Zahl der Vergleichsmöglichkeiten (n=23) zwischen zytoimmunologischem Monitoring und Histologie in dieser Studie zu gering, um eine Einteilung in Abstoßungsgrade zu erzielen.
3. Bis heute ist nicht geklärt, inwieweit sich das Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten durch die Separation über den Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten verändert. Unter Umständen verfälscht auch die Zytozentrifuge dieses Verhältnis. Preud'Homme et al. (166) beschreiben, daß Monozyten im Konzentrat angereichert werden.
Durch eine relative Verlaufskontrolle, d.h. Vergleich der jeweiligen Ergebnisse mit denen des Vortages, kann diese Fehlerquelle umgangen werden.
4. Die humorale Transplantatabstoßung weist die gleichen zytoimmunologischen Veränderungen wie die virale Infektion auf. Eine zytoimmunologische Differentialdiagnose ist nicht möglich. Nur mit der Endomyokardbiopsie kann eine Unter-

scheidung getroffen werden. Da humorale Abstoßungen bei Herztransplantationen im allogenen System nur selten beschrieben wurden, dürfte dieser Nachteil von zweitrangiger Bedeutung sein. Im Fall einer klinischen xenogenen Herztransplantation muß das zytoimmunologische Monitoring um immunologische Untersuchungen, die eine Differenzialdiagnose zwischen humoraler Abstoßung und viraler Infektion ermöglichen, ergänzt werden.

7. Ausblick:

Das zytoimmunologische Monitoring besitzt eine zufriedenstellende Wertigkeit. Eine objektive Beurteilung seiner diagnostischen Fähigkeit kann nur erhalten werden, wenn es als einziger Test zur postoperativen Überwachung verwendet wird. Aus diesem Grund wurden die Versuchstiere auf zweierlei Weise postoperativ kontrolliert: Gruppe 1 mit der Endomyokardbiopsie und Gruppe 2 mit dem zytoimmunologischen Monitoring. Wie Tab. 8 zeigt, ergaben sich hinsichtlich des postoperativen Verlaufes keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen. Das zytoimmunologische Monitoring ist in der Lage, auch ohne Hilfe der Endomyokardbiopsie Aufschlüsse über den Immunstatus des Empfängers zu geben. Eine Kombination beider Verfahren bietet sich als optimale Lösung an: Das zytoimmunologische Monitoring liefert bei aktiviertem mononukleärem Konzentrat die Indikation zur Endomyokardbiopsie. Ein unauffälliges zytoimmunologisches Monitoring bedeutet Verzicht auf die routinemäßig vorgesehene Endomyokardbiopsie. Dadurch kann die Zahl der routinemäßig durchgeführten Endomyokardbiopsien reduziert werden.

Dieses postoperative Überwachungsschema wird bereits seit einigen Monaten erfolgreich in der herzchirurgischen Klinik Großhadern angewendet. Die Zahl der routinemäßig durchgeführten Endomyokardbiopsien konnte bisher um 43 % gesenkt werden (71).

Das zytoimmunologische Monitoring in Kombination mit der Endomyokardbiopsie bietet die Möglichkeit einer lückenlosen und zuverlässigen postoperativen Überwachung herztransplantierte Patienten.

LITERATUR

1. ABOUNA, G.M., COOK, J.S., FISHER, L.M., STILL, W.J., COSTA, G., HUME, D.M.:
Treatment of acute hepatic coma by ex vivo baboon and human liver perfusions
Surgery, Vol. 71, 537 (1972)
2. ARNESEN, E., BONDEVIK, H.:
Donor-specific cellular and humoral immunity after clinical kidney transplantation
Transplantation, Vol. 21, 489 (1976)
3. BAILEY, L.L., YUNG, J., JOHNSON, W.:
Orthotopic cardiac xenografting in the newborn
Presented at the Tenth Annual Meeting of the Western Thoracic Surgical Association, June 20-23 (1984)
4. BANKHURST A.D., WARNER, N.L., SPRENT, J.:
Surface immunoglobulins on thymus and thymus-derived lymphoid cells
J.exp.Med., Vol. 134, 1005 (1971)
5. BARNARD, C.N.:
A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Capetown
South African M.J., Vol. 41, 1271 (1967)
6. BARNARD, C.N., WOLPOWITZ, A., LOSMAN, J.G.:
Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass
South African, M.J., Vol. 52, 1035 (1977)
7. BASTEN, A., MILLER, J.F., SPRENT, J., PYE, J.:
A receptor for antibody on B lymphocytes: I. method of detection and functional significance
J. exp. Med., Vol. 135, 610 (1972)
8. BASTEN, A., WARNER, N.L., MANDEL, T.:
A receptor for antibody on B lymphocytes: II. Immunochemical and electron microscopy characteristics
J. exp. Med., Vol. 135, 627 (1972)

9. BEGEMANN, H.:
Praktische Hämatologie
Thieme Verlag (1982)
10. BERKEN, A., BENACERRAF, B.:
Properties of antibodies cytophilic for macrophages
Immunology, Vol. 20, 119 (1965)
11. BIEBER, C.P., GRIEPP, R.B., OYER, P.E., DAVID, L.A., STINSON, E.B.:
Relationship of rabbit ATG serum clearance rate to circulating T-cell level, rejection onset, and survival in cardiac transplantation
Transplant. Proc., Vol. 9, 1031 (1977)
12. BILLINGHAM, M.E.:
Diagnosis of cardiac rejection by endomyocardial biopsy
Heart Transplant., Vol. 1, 25 (1981)
13. BILLINGHAM, M.E.:
Some recent advances in cardiac pathology
Human Pathology, Vol. 10, 367 (1979)
14. BILLINGHAM, M.E., BRENT, L., MEDAWAR, P.B.:
Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. the origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity
Proc. R. Soc. Land. Biol., Vol., 143, 58 (1954)
15. BILLINGHAM, M.E., CAVES, P.K., DONG, E., SHUMWAY, N.E.:
The diagnosis of canine orthotopic cardiac allograft rejection by transvenous endomyocardial biopsy
Transplant. Proc., Vol. 5, 741 (1973)
16. BILLINGHAM, M.E., WARNKE, R., WEISSMAN, I.L.:
The cellular infiltrate in cardiac allograft rejection in mice
Transplantation, Vol. 23, 171 (1977)

17. BRENDDEL W., HAMMER, C., CHAUSSY, C.:
Grundlagen und Ergebnisse xenogener Organtransplantation
Transplantationschirurgie, Springer-Verlag 1981
18. BOREL, J.F.:
Immunological properties of cyclosporin A
Heart Transplantation, Vol. 1, 237 (1982)
19. BOREL, J.F.:
Cyclosporin: historical perspectives
Transplant Proc., Vol. 15, 2219 (1983)
20. BOREL, J.F.:
Cyclosporin A
Triangel, Vol. 20, 92 (1981)
21. BOREL, J.F.:
Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on
cell-mediated cytotoxicity
Immunology, Vol. 31, 631 (1976)
22. BOREL, J.F., FEURER, C., MAGNEE, C., STÄHELIN, H.:
Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in
animals
Immunology, Vol. 32, 1017 (1977)
23. BOUWER, H.G., HINRICHS, D.J.:
Cyclosporine effects on mitogen-induced T- and B-cell pro-
liferation
Transplant. Proc., Vol. 15, Suppl. 1, 2306 (1983)
24. BOYUM, A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human
blood
Scan. J. Clin. lab. Invest., Vol. 21, 77 (1968)

25. BRAIN, P., GORDON, J.:
Rosette formation by peripheral lymphocytes: II. inhibition of the phenomenon
Clin. Exp. Immunol., Vol. 8, 1 (1971)
26. BREGMAN, D., DRUSIN, R., LAMB, J., REEMTSMA, K., ROSE, E.:
Heart transplanttion in patients requiring mechanical circulatory support
Heart Transplantation, Vol. 1, 154 (1982)
27. BRETSCHNEIDER, M.J.:
Optimalization of myocardial protection
Paper presented at the International Symposium, Göttingen, West Germany, May 13-15 (1979)
28. BUNJES, D., HARDT, C., RÖLLINGHOFF M., WAGNER, H.:
Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2
Eur. J. Immunol., Vol. 11, 657 (1981)
29. BYFIELD, P.E., BARTH, C.L., BRODIE, J.A., COSIMI, A.B., DIENST, S.G., ELBERG, A.J. ELFRING, G.L. HARDY, M.A., HAYASHI, H., KOUNTZ, S.L., LAMBORN, K.R., LOUGHMAN, B.E., SAKAI, A., SATOH, P.S., ZIELINSKI, C.M., WECHTER, W.J.:
the use of circulating rosette-forming cells as a guide to determination of ATG dose (dose-by-rosette)
Transplant. Proc., Vol. 10, 627 (1978)
30. CABROL, C., GANDJBAKHCH, I., PAVIE A., BORS, V., CABROL, A., MATTEI, M.F., LEGER, P., AUPETIT, A.B.:
Heart transplantation at La Pitie Hospital, Paris, 1968-1984
Heart Transplantation, Vol. 4, 27 (1984)
31. CABROL, C., GANDJBAKHCH, I., PAVIE, A., CABROL, A., MATTEI, M.F., LIENHART, A., GLUCKMAN, J.C., ROTTEMBOURG, J.:
Cardiac transplantation at La Pitie Hospital
Heart Transplanatation, Vol. 2, 244 (1983)
32. CALNE, R.Y.:
Organ transplantation between widely disparate species
Transplant. Proc., Vol. 2, 550 (1970)

33. CALNE, R.Y.:
Immunosuppression for organ grafting-observations on cyclosporin A
Immunological Rev., Vol. 46, 113 (1979)
34. CALNE, R.Y., ROLLES, K., WHITE, D.J., THIRU, S., EVANS, D.B.,
HENDERSON, R., HAMILTON, D.L., BOONE, N., MCMASTER, P., GIBBY, O., WILLIAMS R.:
Cyclosporin A in clinical organ grafting
Transplant. Proc., Vol. 13, 349 (1981)
35. CAVES P.K., BILLINGHAM, M.E., SCHULZ, W.B., DONG, E., SHUMWAY, N.E.:
Transvenous biopsy from canine orthotopic heart allografts
American Heart Journal, Vol. 85, 525 (1973)
36. CAVES, P.K., BILLINGHAM, M.E, STINSON, E., SHUMWAY, N.E.:
Serial transvenous biopsy of the transplanted human heart, improved management of acute rejection episodes
Lancet, 1974, 822
37. CAVES, P.K., DONG, E., MORRIS, J.R., SHUMWAY, N.E.:
The immunologic diagnosis of orthotopic cardiac allograft rejection in dogs
Transplant. Proc., Vol. 5, 745 (1973)
38. CAVES, P.K., STINSON, E.B., BILLINGHAM, M.E., RIDER, A.K., SHUMWAY, N.E.:
Diagnosis of human cardiac allograft rejection by serial cardiac biopsy
J. Thoracic Cardiovascular Surg., Vol. 66, 461 (1973)
39. CAVES, P.K., STINSON, E.B., GRAHAM, A.F., BILLINGHAM, M.E., GREHL, T.M., SHUMWAY, N.E.:
Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy
JAMA, Vol. 225, 228 (1973)
40. CAVES, P.K., SCHULZ, W.P. DONG, E., STINSON, E., SHUMWAY, N.E.:
New instrument for transvenous cardiac biopsy
American J. Cardiology, Vol. 33, 264 (1974)

41. CERILLI, J., GIDEON, L., HATTAN, D.:
Effect of immunosuppression and cellular antigen on xenograft survival
Transplant. Proc., Vol. 2, 516 (1979)
42. CHATENOUD, L., BACH, J.F.:
The use of monoclonal antibodies for the follow-up of transplanted patients
Heart Transplantation, Vol.2, 47 (198)
43. CHAUSSY, C., HAMMER, C., EISENBERGER F., V.SCHEEL, J., LAND, W., PIELSTICKER, K., BRENDDEL, W.:
Some aspects of the rejection of xenogeneic kidney transplants in different donor recipient combinations
Presented on the 7th Congress of the European Society for Experimental Surgery (1972)
44. CHAUSSY, C., HAMMER, C., V. SCHEEL, J., EISENBERGER, F., PIELSTICKER, K., BRENDDEL, W.:
Experimental xenogeneic kidney transplantation in closely related species
Res.exp.Med., Vol. 159, 266 (1973)
45. CHAUSSY, C., HAMMER, C., V. SCHEEL, J., PIELSTICKER, K., SOLLINGER, H.W., PFEIFER, K.J., PONGRATZ, H., BRENDDEL, W.:
Xenogeneic skin and kidney transplants in a closely related canine system, fox-dog
Transplantation, Vol. 20, 150 (1975)
46. COLLINS, J.J.:
Initial clinical experience Bringham and Women's Hospital
Heart Transplantation, Vol. 4, 15 (1984)
47. COLVIN, R.B., COSIMI, A.B., BURTON, R.C., DELMONICO, F.L., JAFFERS, G., RUBIN, R.H., TOLKOFF-RUBIN, N.E., GIORGI, J.V., MCCLUSKEY, R.T., RUSSEL, P.S.:
Circulating T-cell subsets in 72 human renal allograft recipients: the OKT 4/OKT 8 cell ratio correlates with reversibility of graft injury and glomerulopathy
Transplant. Proc., Vol. 15, 1166 (1983)
48. COOLEY, D.A.:
Staged cardiac transplantation: report of three cases
Heart Transplantation, Vol. 1, 145 (1982)

49. COOLEY, D.A., HALLMANN, G.L., BLOODWELL, R.D.:
Human heart transplantation
Am. J. Cardio., Vol. 22, 804 (1968)
50. COOLEY, D.A., AKUTSU, T., NORMAN, J.C., SERRATO, M.A., FRAZIER, O.H.:
Total artificial heart in two-staged cardiac transplantation
Cardiovascular Diseases, Bulletin of the Texas Heart Institute, Vol. 8, 305 (1981)
51. COOLEY, D.A., FRAZER, O.H., PAINVIN, G.A., BOLDT, L., KAHAN, B.D.:
Cardiac and cardiopulmonary transplantation using cyclosporin for immunosuppression: recent Texas Heart Institute experience
Transplant. Proc., Vol. 15, 2567 (1983)
52. COOMBS, R., GURNER, B.W., WILSON, A., HOLM, G., LINDGREN, B.:
Rosette formation between human lymphocytes and sheep red blood cells not involving immunoglobulin receptors
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., Vol. 39, 658 (1979)
53. COOPER, D.K.:
The donor heart - the present position with regard to resuscitation, storage and the assessment of viability
J.Surg. Res., Vol. 21, 363 (1976)
54. COPELAND, J.G., SALOMON, N.W., MAMMANA, R.B., SIROKY, K., LARSON, D.:
Cardiac transplantation, a two-year experience
Heart Transplantation, Vol. 1, 67 (1981)
55. CORRY, R.J., KELLEY, S.E.:
Immunological enhancement of primarily vascularized rat heart xenotransplants in mice
Transplantation, Vol. 18, 503 (1974)
56. CORY-PEARCE, R., WALLWORK, J., ENGLISH, T.A.:
Cardiac transplantion at Papworth Hospital
Heart Transplantation, Vol. 4, 16 (1984)

57. COSIMI, A.B., COLVIN, R.B., BURTON, R.C., WINN, H.J., RUBIN, R., GOLDSTEIN, G., KUNG, P.C., HOFFMAN, R.A., HANSEN, W.P., RUSSELL, P.S.:
Immunologic monitoring with monoclonal antibodies to human T-cell subsets
Transplant. Proc., Vol. 13, 1589 (1981)
58. COSIMI, A.B., DELMONICO, F.L., BURDICK, J.F., RUSSELL, P.S.:
Individualized management of immunosuppression according to serial monitoring of immunocompetence
Transplant.Proc., Vol. 10, 647 (1978)
59. DAWKINS, K.D., OLDERSHAW, P.J., BILLINGHAM, M.E., HUNT, S.A., OYER, P.E., JAMIESON, S.W., POPP, R.L., STINSON, E.B., SHUMWAY, N.E.:
Changes in diastolic function as a noninvasive marker of cardiac allograft rejection
Heart Transplantation, Vol. 3, 286 (1984)
60. DEVINENI, R., MCKENZIE, N., KOSTUK, W.J., HEIMBECKER R.O., KEOWN, P., STILLER C., SILVER, M.D.:
Cyclosporine in cardiac transplantation: observations on immunologic monitoring, cardiac histology, and cardiac function
Heart Transplantation, Vol. 2, 219 (1983)
61. DICKLER, H.B., ADKINSON, N.F., TERRY, W.D.:
Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers
Nature, Vol. 247, 213 (1974)
62. DICKLER, H.B., KUNKEL H.G.:
Interaction of aggregated gamma-globulin with B lymphocytes
J. exp.Med., Vol. 136, 191 (1972)
63. DIMITRIU, A., DEBRAY-SACHS, M., DESCAMPS, B., SULTAN, C., HAMBURGER, J.:
Tritiated thymidine incorporation in blood leukocytes of renal allograft recipients
Transplant. Proc., Vol. 3, 1577 (1971)
64. DONAWICK, W.J., SHAFFER, C.F., DODD, D.C., BUCHANAN, J.W., FREGIN, G.F.:
Cardiac and skin heterograft rejection: suppression with antilymphocyte serum
Transplant.Proc., Vol. 3, 551 (1971)

65. DORE, C.F., BALFOUR, B.M.:
A device for preparing cell spreads
Immunology, Vol. 9, 401 (1965)
66. DOSSETOR, J.B., MYBURGH, J.A.:
Posttransplant immunologic monitoring: summation
Transplant.Proc., Vol. 10, 661 (1978)
67. DUBERNARD, J.M., BONNEAU, M., BOMEL, J., MONTAGARD, J.,
BLITZ, M., LATOUR, M., BLANC-BRUNAT, N., FRIES, D., BRO-
CHARD, J.C., BANSILLON, V., BANSILLON, G., CAPODICASA, G.:
Renal and skin xenografts from baboons to macaques: effect
of antilymphocyte globulins
Transplant.Proc., Vol. 3, 545 (1971)
68. DUSWALD, K.H., V.SCHEEL, J., HAMMER, C., BRENDDEL, W.:
Langzeitüberleben von Hauttransplantaten im xenogenen System
Wolf-Hund
Res.exp.Med., Vol. 267, 255 (1976)
69. ENGLISH, T.A., CORY-PEARCE, R., MCGREGOR, C., WALLWORK, J.:
Cardiac transplantation: 3.5-year experience at Papworth
Hospital
Transplant.Proc., Vol. 15, 1238 (1983)
70. ERTEL, W., REICHENSPURNER, H., LERSCH, C., HAMMER, C., PLAHL,
M., LEHMANN, M., KEMKES, B.M., OSTERHOLZER, G., REBLE, B.,
REICHART, B., BRENDDEL, W.:
Cyto-immunological monitoring enables to differentiate bet-
ween cardiac rejection, viral, bacterial or fungal infec-
tions in patients blood
Heart Transplantation, in Press (1985)
71. ERTEL, W., REICHENSPURNER, H., HAMMER, C., LERSCH, C., PLAHL,
M., BRENDDEL, W., REICHART, B., KEMKES, B.M., REBLE, B., GO-
KEL, J.M.:
Cytoimmunological monitoring: a method to reduce biopsy fre-
quency after cardiac transplantation
Transplant.Proc., Vol. 17, 204 (1985)
72. EVANS, R.W., MANNINEN, D.L., GERSH, B.J., HART, L.G., RODIN,
J.:
The need for and supply of donor hearts for transplantation
Heart Transplantation, Vol. 4, 57 (1984)

73. FLOERSHEIM, G.L.:
A study of combined treatment with chemical immuno-suppressants and antilymphocytic serum to prolong skin allograft survival
Transplantation, Vol. 8, 392 (1969)
74. FORBES, R.D., GUTTMANN, R.D.:
Mechanisms of humoral-mediated cardiac allograft rejection in vivo: controlled, comparative morphological studies utilizing inbred rat models
Heart Transplantation, Vol. 1, 196 (1982)
75. FORBES, R.D., GUTTMANN, R.D., KURAMOCHI, T.:
Controlled studies of the pathogenesis of hyperacute cardiac allograft rejection in actively immunized recipients
Transplant. Proc., Vol. 9, 301 (1977)
76. FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.:
Pharmacologie und Toxikologie
Bibliographisches Institut, Mannheim, B-I-Wissenschaftsverlag, 1983
77. GAILIUNAS, P., SUTHANTHIRAN, M., PERSON, A., STROM, T.B., CARPENTER, C.B., GAROVY, M.R.:
Posttransplant immunologic monitoring of the renal allograft recipient
Transplant.Proc., Vol. 10, 609 (1978)
78. GAMS, E., BORNIKOEL, K., HAGL, S., MEISNER, H., MENDLER, N., RING, J., SCHMIDT-HABELMANN, P., SCHRAUT, W., SEBENING, F., STRUCK, E.:
Heterotopic allogeneic heart transplantation in dogs
Europ. surg. Res., Vol. 5, 202 (1973)
79. GAMS, E., CHAUSSY C., ECKERSDORF, B., HAGL, S., HAMMER, C., LAND, W., PIELSTICKER, K., SCHRAUT, W., SEBENING, F.:
Xenogene heterotope Herztransplantation im nahe stammesverwandten Speciesystem Fuchs-Hund
Res.exp.Med., Vol. 157, 228 (1972)
80. GILES, G.R., BOEHMIG, H.J., AMEMIYA, H., HALGRIMSON, C.G., STARZL, T.E.:
Clinical heterotransplantation of the liver
Transplant.Proc., Vol.2, 506 (1970)

81. GORDON, M.Y., SINGER, J.W.:
Selective effects of cyclosporin A on colony-forming lymphoid and myeloid cells in man
Nature, Vol., 279, 433 (1979)
82. GREEN, C.J., KEMP, E., KEMP, G.:
The effects of cyclosporin A, ticlopidine hydrochloride and cobra venom factor on the hyperacute rejection of discordant renal xenografts
Invest.Cell Pathol., Vol. 3, 415 (1989)
83. HÄYRY, P., VON WILLEBRAND, E., AHONEN, J., LINDSTRÖM, B.L., EKKLUND, B.:
Use of fine-needle aspiration cytology of the in situ inflammatory response of kidney allograft rejection and the impact of glucocorticosteroids on the inflammation
Transplant.Proc., Vol. 12, 331 (1980)
84. HAGL, S., BECK, G., BRENDDEL, W., LAND, W., MAYR, N., MENDLER, N., PIELSTICKER, K., SEBENING, F.:
Xenogenic heart transplantation in a closely related species system, fox-dog
Medical Res. in Progress, Vol. 1, 3 (1971)
85. HAGL, S., BECK, G., BRENDDEL, W., LAND, W., MAYR, N., MENDLER, N., PIELSTICKER, K., SEBENING, F.:
Xenogene Herztransplantation im nah stammesverwandten Speziessystem Fuchs-Hund
Deutsche Med.Wochenschrift, Vol. 96, 216 (1971)
86. HALL, B.M.:
The cellular immune basis of cardiac allograft rejection
Heart Transplantation, Vol. 3, 260 (1984)
87. HALL, B.M., DORSCH, S., ROSER, B.:
The cellular basis of allograft rejection in vivo - I the cellular requirements for the first-set rejection of heart grafts
J.exp.Med., Vol. 148, 878 (1978)
88. HALL, B.M., DORSCH, S., ROSER, B.:
The cellular basis of allograft rejection in vivo - II the nature of memory cells mediating second - set heart graft rejection
J.exp.Med., Vol. 148, 890 (1978)

89. HAMMER, C., CHAUSSY, C., BRENDDEL, W.:
Preformed natural antibodies in animals and man
Europ.Surg.Res., Vol. 5, 162 (1973)
90. HAMMER, C., CHAUSSY, C., V.SCHEEL, J., PONGRATZ, H., ROSCHER, E., BRENDDEL, W.:
Survival times of skin and kidney grafts within different canine species in relation to their genetic markers
Transplant.Proc., Vol. 7, 439 (1975)
91. HAMMER, C., CHAUSSY, C., V.SCHEEL, J., VRIESENDORP, H.M., PFEIFFER, K.J., BRENDDEL, W.:
Kidney transplantation in the fox-dog system - treatment with horse-anti-dog antilymphocyte globulin (ALG) and horse-anti-dog antimacrophage serum (AMS)
Joint Report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics
92. HAMMER, C., LAND, W., BRENDDEL, W.:
Experimentelle Xenotransplantation in entfernt stammesverwandten Speciessystemen
Res.exp.Med., Vol. 159, 239 (1973)
93. HAMMER, C., LAND, W., HILLEBRAND, E., RÜSSLER, E.:
Überwachung von Nierenabstoßungsreaktionen durch Feinnadelaspirationszytologie
Chir.Forum 1982, Langenbecks Archiv, Chir.Suppl. 1982, 17, Springer-Verlag
94. HAMMER, C., LAND, W., PIELSTICKER, K., BRENDDEL, W.:
Experimentelle Xenotransplantation in entfernt stammesverwandten Speciessystemen
Res.exp.Med., Vol. 159, 124 (1972)
95. HAMMER, C., REICHENSPURNER, H., ERTEL, W., LERSCH, C., PLAHL, M., BRENDDEL, W., REICHART, B., ÜBERFUHR, P., WELZ, A., KEMKES, B.M., REBLE, B., FUNCCIUS, W., GOKEL, M.:
Cytological and immunologic monitoring of cyclosporine-treated human heart recipients
Heart Transplantation, Vol. 3, 228 (1984)
96. HARDY, J.D., CHAVEZ, C.M., KURRUS, F.D., NEELY, W.A., ERASLAN, S., TURNER, M.D., FABIAN, L.W., LABECKI, T.D.:
Heart transplantation in man
Jama, Vol. 188, 1132 (1964)

97. HARDY, M.A., OLUWOLE, S., FAWWAZ, R., SATAKE, K., NOWYGRAD, R., REEMTSMA, K.:
Selective lymphoid irradiation
Transplantation, Vol., 33, 237 (1982)
98. HECKNER, F.:
Praktikum der mikroskopischen Hämatologie
Urban & Schwarzenberg Verlag 1981
99. HEILMEYER, L., BEGEMANN, H.:
Atlas der klinischen Hämatologie
Springer Verlag, 1-77 (1978)
100. HERSH, E.M., BUTLER, W.T., ROSSEN, R.D., MORGAN, R.O., SUKI, W.:
In vitro studies of the human response to organ allografts: appearance and detection of circulating activation lymphocytes
J.Immunology, Vol. 107, 571 (1971)
101. HITCHCOCK, C.R., KISER, J.C., TELANDER, R.L., SELJESKOG, E.L.:
Baboon renal grafts
Jama, Vol. 189, 934 (1964)
102. HOMAN, W.P., FABRE, J.W., WILLIAMS, K.A., MILLARD, P.R., MORRIS, P.J.:
Studies on the immunosuppressive properties of cyclosporin A in rats receiving renal allografts
Transplantation, Vol. 29, 361 (1980)
103. HOMAN, W.P., FRENCH, M.E., FABRE, J.W., MILLARD, P.R., DENTON, T.G., MORRIS, P.J.:
The interaction of cyclosporin A with other immunosuppressive agents in dog recipients of renal allografts
Transplant.Proc., Vol. 12, 287 (1980)
104. HOMAN, W.P., FRENCH, M.E., MORRIS, P.J.:
Effect of Cyclosporin A upon the function of ischemically damaged renal autografts in the dog
Transplantation, Vol. 30, 228 (1980)

105. HOMAN, W.P., WILLIAMS, K.A., FABRE, J.W., MILLARD, P.R., MORRIS, P.J.:
Prolongation of cardiac xenograft survival in rats receiving cyclosporin A
Transplantation, Vol. 31, 164 (1981)
106. HUDSON, L., SPRENT, J., MILLER, J.F., PLAYFAIR, J.H.:
B cell-derived immunoglobulin on activated mouse T lymphocytes
Nature, Vol. 251, 60 (1974)
107. HUTCHINSON, I.F., SHADUR, C.A., DUARTE, A., BALDWIN III, W.M., STROM, T.B., TILNEY, N.L.:
Mechanisms of cardiac allograft prolongation by cyclosporin A
Transplant.Proc., Vol. 13, 412 (1981)
108. HUTCHINSON, I.F., SHADUR, C.A., DUARTE, J.S., STROM, T.B., TILNEY, N.L.:
Cyclosporin A spares selectively lymphocytes with donor-specific suppressor characteristics
Transplantation, Vol.32, 210 (1981)
109. JABOULAY, M.:
Greffe de reins au pli du conde par soudures arterielles et veineuses
Bulletin du Lyon Medical, Vol. 107, 575 (1906)
110. JAMIESON, S.W., BURTON, N.A., REITZ, B.A., SHUMWAY, N.E.:
A new method for heterotopic cardiac transplantation in the dog
J. Surg.Res., Vol. 32, 150 (1982)
111. JAMIESON, S.W., BURTON, N.A., BIEBER, C.P., REITZ, B.A., OYER, P.E., STINSON, E.B., SHUMWAY, N.E.:
Cardiac-allograft survival in primates treated with cyclosporin A
Lancet, 1979, 545
112. JEEKEL, J., DE PUTTER, C., LAMEYER, L.D., WESTBROEK, D.L.:
The survival of mouse skin and heart heterografts in rats treated with xenogeneic hyperimmune antidonor serum
Transplantation, Vol. 17, 605 (1974)

113. KAKITA, A., BLANCHARD, J., FORTNER, J.G.:
Hamster-to-rat cardiac xenografts
J.Surg. Res., Vol. 19, 99 (1975)
114. KEMP, E., KEMP, G., LARSEN, S., STARKLINT, H.:
Renal xenografting - survival of rabbit kidneys transplanted
to cats up to one week. Assessment of function, light and
immunofluorescence - microscopy
Presented at the 8th International Congress of Nephrology,
Athens 1981, June 7-12
115. KEMP, E.:
Xeno grafting - the future of organ transplantation
Odense University press 1978
116. KEMP, E., KEMP, G., STARKLINT, H., LARSEN, S.:
Immunosuppression with cobra venom factor, anti-platelet
aggregator, and cyclosporin A in renal xenotransplantation
Transplant.Proc., Vol. 14, 116 (1982)
117. KEOWN, P.A., ESSERY, G.L., STILLER, C.R., SINCLAIR, N.R.,
MULLEN, R., ULAN, R.A.:
Mechanisms of immunosuppression by cyclosporin
Transplant.Proc., Vol. 13, 386 (1981)
118. KEREN, A., GILLIS, A.M., FREEDMAN, R.A.:
Heart transplant rejection monitored by signal averaged ECG
in patients receiving cyclosporin A
Circulation, Vol. 68 (suppl. III), 151 (1983)
119. KING, M.C., WILSON, A.C.:
Evolution at two levels in humans and chimpanzees
Science, Vol. 188, 107 (1975)
120. KOLFF, W.J.:
For the clinical application of the artificial heart
Heart Transplantation, Vol. 1, 159 (1982)

121. KUMAGAI, K., ABO, T., SEKIZAWA, T., SASAKI, M.:
Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes
J.Immunology, Vol. 115, 982 (1975)
122. KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., REINHERZ, E.L., SCHLOSSMAN, S.F.:
Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens
Science, Vol. 206, 347 (1979)
123. KUNKL, A., KLAUS, G.G.:
Selective effects of cyclosporin A on functional B cell subsets in the mouse
J.Immunology, Vol. 127, 2526 (1980)
124. KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., TILNEY, N.L.:
Heart transplantation in the rat: mechanisms of rejection and graft prolongation
Heart Transplantation, Vol. 1, 93 (1982)
125. LAND, W.:
Möglichkeiten und Grenzen der xenogenen Organtransplantation
Der Chirurg, Vol. 42, 172 (1971)
126. LAND, W., BRENDDEL, W., HAMMER, C., HOLPER, K., KLÖVEKORN, W.P., LOB, G., MERZEL, D., MESSMER, K., SEIFERT, J., SUNDER-PLASSMANN, L.
Modifikation der hyperakuten xenogenen Abstoßungsreaktion
Res.exp.Med., Vol. 157, 259 (1972)
127. LAND, W., CORRELL, J., PIELSTICKER, K., BRENDDEL, W.:
Renale in vitro-Xenohämoperfusion in verschiedenen Specieskombinationen
Res. exp.Med., Vol. 159, 276 (1973)
128. LAND, W., HAMMER, C., FIEDLER, L., BRENDDEL, W.:
Experimentelle Xenotransplantation in entfernten stammesverwandten Speciessystemen
Res.exp.Med., Vol. 158, 1 (1972)

129. LEAPMAN, S.B., FILO, R.S., SMITH, E.J., SMITH, P.G.:
Differential effects of cyclosporin-A on lymphocyte subpopulations
Transplant.Proc., Vol. 13, 405 (1981)
130. LEAPMAN, S.B., STRONG, D.M., ALPERT, S., FEDUSKA, N.J.,
SELL, K.W.:
Lymphocyte monitoring as a predictor of renal allograft rejection
Ann.Surg., Vol. 186, 568 (1977)
131. LINN, B.S., JENSEN, J.A., PARDO, V., DAVIES, D., FRANKLIN,
L.:
Relationship between structural and functional changes in
rejecting renal xenografts
Transplant.Proc., Vol. 3, 527 (1971)
132. LINN, B.S., JENSEN, J.A., PORTAL, P., SNYDER, G.B.:
Renal xenograft prolongation by suppression of natural anti-
body
J.Surg.Res., Vol. 8, 211 (1968)
133. LOWER, R.R., DONG, E., GLAZENER, F.S.:
Electrocardiograms of dogs with heart homografts
Circulation, Vol. 33, 455 (1966)
134. MARCEAU, J.P., HALLENBECK, G.A., ZOLLMANN, P.E., BUTLER,
H.C., SHORTER R.G.:
A comparison of autoplasic, allogeneic and xenogeneic per-
fusion of isolated kidneys
JSR, Vol. 5, 492 (1965)
135. MARCHALONIS, J.J., CONE, R.E., ATWELL, J.L.:
Isolation and partial characterization of lymphocyte surface
immunoglobulins
J.exp.Med., Vol. 135, 956 (1972)
136. MCDONALD, J.C., LEE, J.H.:
Spontaneous blastogenic transformation
Arch Surg., Vol. 109, 320 (1974)

137. MCGREGOR, C.G., JAMIESON, S.W., OYER, P.E., BALDWIN, J.C., MODRY, D.L., HUNT, S.A., BILLINGHAM, M.E., MILLER, J.L., GAMBERG, P.L., STINSON, E.B., SHUMWAY, N.E.:
Heart transplantation at Stanford University
Heart Transplantation, Vol. 4, 31 (1984)
138. MCKENZIE, F.N., STILLER, C.R., WALL, W.J., KEOWN, P., SILVER, M.D., PAINVIN, A., HEIMBECKER, R.O.:
Studies of canine heterotopic heart allograft treated with cyclosporin A
Transplant.Proc., Vol. 15, 1244 (1983)
139. MENDES, N.F., TOLNAI, M.E., SOLVEIRA, N.P., GILBERTSEN, R.B., METZGAR, R.S.:
Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte-binding (T) lymphocytes
J.Immunology, Vol. 111, 860 (1973)
140. MENDEZ-PICON, G.J., GOLDMAN, M.H., WOLFGANG, T.C., SZENT-PETERY, S.S., DUCEY, K.F., HESS, M.L., HASTILLO, A., GUERRA-TY, A.J., LOWER, R.R.:
Long-distance procurement and transportation of human hearts for transplantation
Heart Transplantation, Vol. 1, 62 (1981)
141. MERKEL, F.K., BIER, M., BEAVRS, C.D., MERRIMAN, W.G., WILSON, C., STARZL, T.E.:
Modification of xenograft response by selective plasmapheresis
Transplant.Proc., Vol. 3, 534 (1971)
142. MESSMER, K., HAMMER, C., LAND, W., FIEDLER, L., KLÖVEKORN, W.P., HOLPER, K., LOB, G., MERZEL, D., BRENDEN W.:
Modification of hyperacute xenogeneic kidney rejection
Transplant.Proc., Vol. 3, 542 (1971)
143. MOBERG, A.W., SHONS, A.R., GEWURZ, H., MOZES, M., NAJARIAN, J.S.:
Prolongation of renal xenografts by the simultaneous sequestration of preformed antibody, inhibition of complement, coagulation and antibody synthesis
Transplant.Proc., Vol. 3, 538 (1971)

144. MÖLLER, G.:
Demonstration of mouse isoantigens at the cellular level by the fluorescent antibody technique
J.exp.Med., Vol. 114, 415 (1961)
145. MORRIS, P.J.:
Cyclosporin A
Transplantation, Vol. 32, 349 (1981)
146. MORRIS, R.E.:
Cellular enzyme-linked immunospecific assay (celisa)
Transplantation, Vol. 36, 719 (1983)
147. MORRIS, R.E., DONG, E., STRUTHERS, C.M., GRIEPP, R.B., STINSON, E.B.:
Immunologic monitoring of cardiac transplant recipients by a modified reactive leukocyte blastogenesis assay (MRLB)
Transplant.Proc., Vol. 10, 585 (1978)
148. MORRIS, E.R., HOROWITZ, D.A.:
Cellular enzyme-linked immunospecific assay (celisa)
J.Immunological Methods, Vol. 68, 11 (1984)
149. MOZES, M.F., GEWURZ, H., GUNNARSON, A., MOBERG, A.W., WESTBERG, N.G., JETZER, T., NAJARIAN, J.S.:
Xenograft rejection by dog and man: isolated kidney perfusion with blood and plasma
Transplant.Proc., Vol. 3, 531 (1971)
150. MULLERWORTH, M.H., LIXFELD, W., RACHKEWICH, R.A., GOLDMAN, B.S., SILVER, M.D., SHUMAK, K.H., CROOKSTON, J.H.:
Hyperacute rejection of heterotopic heart allografts in dogs
Transplantation, Vol. 13, 570 (1972)
151. MUNDY, A.R.:
Prolongation of cat to dog renal xenograft survival with prostacyclin
Transplantation, Vol. 30, 226 (1980)
152. OGDEN, D.A., SITPRIJA, V., HOLMES, J.H.:
Function of the baboon renal heterograft in man and comparison with renal homograft function
J.Lab. & Clin.Med., Vol. 65, 370 (1965)

153. OSTERHOLZER, G., KEMKES, G.M., REICHENSPURNER, H., ERTEL, W., REBLE, B., PETERS, D., REICHART, B.:
Donor management and clinical results in heart transplantation (HTX) after long distance - as well as multi organ procurement
Presented at the 2nd Congress of the European Society for Organ Transplantation, Munich Nov., 27-29, 1985
154. OWEN, E.R.:
Xenograft protection by low-dose, antigen-induced tolerance
Transplant.Proc., Vol. 3, 562 (1971)
155. OWEN, E.R.:
Prolonged survival in heterografted kidneys with transplantation antigen pretreatment
Nature, Vol. 219, 970 (1968)
156. OYER, P.E., JAMIESON, S.W., STINSON, E.B.:
Cardiac transplantation for end-stage congestive heart failure
Congestive Heart Failure, Grune & Stratton Inc., 19812
157. OYER, P.E., STINSON, E.B., JAMIESON, S.W., HUNT, S.A., PERLROTH, J., BILLINGHAM, M.,D., SHUMWAY, N.E.:
Cyclosporin in cardiac transplantation: A 2 1/2 year follow-up
Transplant.Proc., Vol. 15, Suppl. 1, 2546 (1983)
158. OYER, P.E., STINSON, E.B., JAMIESON, S.W., HUNT, S., REITZ, B.A., BIEBER, C.P., SCHROEDER, J.S., BILLINGHAM, M., SHUMWAY, N.E.:
One year experience with cyclosporin A in clinical heart transplantation
Heart Transplantation, Vol. 1, 285 (1982)
159. PAAVONEN, T., HÄYRY, P.:
Effect of cyclosporin A on T-dependent and T-independent immunoglobulin synthesis in vitro
Nature, Vol. 287, 542 (1989)
160. PAGE, D., POSEN, G., STEWART, T., HARRIS, J.:
Immunological detection of renal allograft rejection in man
Transplantation, Vol. 12, 341 (1971)

161. PELLETIER, L.C., CASTONGUAY, Y., PELLETIER, G.B., DYRDA, I.,
MAILLE, J., SOLYMOSS, C.B.:
Heart transplantation at the Montreal Heart Institute
Heart Transplantation, Vol. 4, 23 (1984)
162. PENNOCK, J.L., OYER, P.E., REITZ, B.A., JAMIESON, S.W., BIE-
BER, C.P., WALLWORK, J., STINSON, E.B., SHUMWAY, N.E.:
Cardiac transplantation in perspective for the future
J.Thorac. Cardivasc.Surg., Vol. 83, 168 (1982)
163. PERPER, R.J.:
Renal heterotransplant rejection
Transplantation, Vol. 12, 519 (1971)
164. PERPER, R.J., NAJARIAN, J.S.:
Experimental renal heterotransplantation - II. closely rela-
ted species
Transplantation, Vol. 4, 700 (1966)
165. PERPER, R.J., NAJARIAN, J.S.:
Experimental renal heterotransplantation
Transplantation, Vol. 4, 377 (1966)
166. PREUD'HOMME, J., FLANDRIN, G.:
Identification by peroxidase staining of monocytes in surfa-
ce immunofluorescence tests
J. Immunology, Vol. 113, 1650 (1974)
167. PRINCETEAU, M.:
Greffes renale
J.Med. Bordeaux, Vol. 26, 549 (1905)
168. RAFF, M.C.:
Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice
distinguishable by immunofluorescence
Immunology, Vol. 19, 637 (1970)

169. RAFF, M.C., STERNBERG, M., TAYLOR, R.B.:
Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells
Nature, Vol. 225, 553 (1970)
170. REEMTSMA, K., MCCracken, B.H., SCHLEGEL, J.U., PEARL, M.:
Heterotransplantation of the kidney: two clinical experiences
Sciences, Vol. 143, 700 (1964)
171. REEMTSMA, K., MCCracken, B.H., SCHLEGEL, J.U., PEARL, M.A.,
PEARCE, C.W., DE WITT, C.W., SMITH, P.E., HEWITT, R.J.,
FLINNER, R.L., CREECH, O.:
Renal heterotransplantation in man
Ann.Surg., Vol. 160, 384 (1964)
172. REEMTSMA, K., MCCracken, B.H., SCHLEGEL, J.U., PEARL, M.A.,
DE WITT, C.W., CREECH, O.:
Reversal of early graft rejection after renal
heterotransplantation in man
Jama, Vol. 187, 691 (1964)
173. REICHART, B:
Herztransplantation 1981
Fortschritte der Medizin, Vol. 99, 603 (1981)
174. REICHART, B., REBLE, B., FUNCCIUS, W., KEMKES, B.M., ÜBER-
FUHR, P. WELZ, A., REICHENSPURNER, H., ERTEL, W., HAMMER,
C., GOKEL, M.:
Heart transplantation at the University of Munich
Heart Transplantation, Vol. 4, 25 (1984)
175. REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., SCHLOSSMAN, S.F.:
Separation of functional subsets of human T cells by a mono-
clonal antibody
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 76, 4061 (1979)
176. ROITT, J.:
Immunologie
Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1977

177. ROSENBERG, J.C., BROERSMA, R.J., BULLEMER, G., MAMMEN, E.F.,
LENAGHAN, R., ROSENBERG, B.F.:
Relationship of platelets, blood coagulation, and fibrinolysis to hyperacute rejection of renal xenografts
Transplantation, Vol. 8, 152 (1969)
178. ROSENBERG, J.C., HAWKINS, E., RECTOR, F.:
Mechanisms of immunological injury during antibody-mediated hyperacute rejection of renal heterografts
Transplantation, Vol. 11, 151 (1971)
179. SHELBY, J., CORRY, R.J.:
The primarily vascularized mouse heart transplant as a model for the study of immune response
Heart Transplantation, Vol. 2, 32 (1982)
180. SHONS, A.R., NAJARIAN, J.S.:
Modification of xenograft rejection by aspirin, dextran, and cinanserin: the importance of platelets in hyperacute rejection
Transplant.Proc., Vol. 6, 435 (1974)
181. SIMPSON, K.M., BUNCH, D.L., AMEMIYA, H., BOEHMIG, H.J., WILSON, C.B., DIXON, F.J., COBURG, A.J., HATHAWAY, W.E., GILES, G.R., STARZL, T.E.:
Humoral antibodies and coagulation mechanisms in the accelerated or hyperacute rejection of renal homografts in sensitized canine recipients
Surgery, Vol. 68, 77 (1970)
182. SLAPAK, M., GREENBAUM, M., BARDAWIL, W., SARAIVIS, C., JOISON, J., MCDERMOTT, W.V.:
Effect of heparin, arvin, liver perfusion, and heterologous antiplatelet serum on rejection of pig kidney by dog
Transplant.Proc., Vol. 3, 558 (1971)
183. STARZL, T.E., IWATSKUKI, S., KLINTMALM, G., SCHRÖTER, G.P., WEIL III, R., KOEP, L.J., PORTER, K.A.:
Liver transplantation, 1980, with particular reference to cyclosporin-A
Transplant.Proc., Vol. 13, 281 (1981)

184. STARZL, T.E., MARCHIORO, TL.L. PETERS, G.N., KIRKPATRICK, C.H., WILSON, W.E., PORTER, K.A., RIFKIND, D., OGDEN, D.A., HITCHCOCK, C.R., WADDELL, W.R.:
Renal heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases
Transplantation, Vol. 2, 752 (1964)
185. STARZL, T.E., WEIL III, R., IWATSUKI, S., KLINTMALM, G., SCHRÖTER, KOEP, L.J., IWAKI, Y., TERASAKI, P.I., PORTER, K.A.:
The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation
Surgery, Gynecology & Obstetrics, Vol. 152, 17 (1980)
186. STILLER, C.R., SINCLAIR, N.R., MCGIRR, D., JEVNIKAR, A., ULAN, R.A.:
Diagnostic and prognostic value of donor-specific post-transplant immune responses: clinical correlates and in vitro variables
Transplant.Proc., Vol. 10, 525 (1978)
187. SUCIU-FOCA, N., BUDA, J.A., THIEM, T. SUCIU T.:
Serial determination of blast cell count during allograft rejection in rats
Transplantation, Vol. 14, 711 (1972)
188. SZENTPETERY, S., GOLDMAN, M., MOHANAKUMAR, T., DUCEY, K., HASSAN, Z., ROBINSON, F., GRAEVE, A., WOODY, D., SALIM, J., MENDEZ-PICON, G., LEE, H.M., MOHANTY, P., LOWER, R.:
Orthotopic Cardiac Transplantation in the Veterans Administration
Heart Transplantation, Vol. 2, 224 (1983)
189. THOMAS, F., LEE, H.M., LOWER, R.R., THOMAS, J.M.:
Value of immunologic monitoring studies of human E, EA, and EAC rosetting lymphocyte subpopulations in renal and cardiac transplantation
Transplant.Proc., Vol. 13, 1599 (1981)

190. TOMITA, K., HARSAKI, H., TAKATANI, S., JACOBS, G.B., KIRALY, R.J., NOSE, Y.:
Total artificial hearts: physiological and technical limitations
Heart Transplantation, Vol. 1, 163 (1982)
191. UNGER, E.:
Nierentransplantation
Klin.Wochenschrift, Vol. 47, 573 (1910)
192. VITETTA, E.S., BIANCO, C., NUSSENZWEIG, V., UHR, J.W.:
Cell surface immunoglobulin
J.exp.Med., Vol. 136, 81 (1972)
193. WHITE, D.J., CALNE, R.Y.:
Cyclosporin A in heart allografting: its immunosuppressive and tolerance-inducing properties
Heart Transplantation, Vol. 1, 102 (1982)
194. WHITE, D.J., CALNE, R.Y., PLUMB, A.:
Mode of action of cyclosporin A: a new immunosuppressive agent
Transplant.Proc., Vol. 11, 855 (1979)
195. WIENER, A.S., MOOR-JANKOWSKI, J.:
Blood groups in anthropoid apes and baboons
Science, Vol. 142, 67 (1963)
196. WOMBLE, J.R., COPELAND, J.G., FULLER J.K., EMERY, R.W., LARSON, D.F., GLASS, S.L., RUSSELL D.H.:
Urinary polyamine levels provide a new test for rejection episodes in cyclosporin-treated heart transplant patients
Heart Transplantation, Vol. 3, Suppl., 178 (1984)
197. YOSHIDA, T.O., ANDERSSON, B.:
Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes
Scan.J.Immunol., Vol. 1, 401 (1972)

ZUSAMMENFASSUNG

Die Herztransplantation hat sich in den letzten Jahren zu einem anerkannten Verfahren in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz entwickelt. Trotz der großen Fortschritte im klinischen und immunologischen Bereich blieben bisher zahlreiche Probleme ungelöst.

Mit Hilfe eines Tiermodells sollten 2 dieser Probleme gelöst werden:

1. der mögliche klinische Einsatz der xenogenen Herztransplantation
2. die Ausarbeitung eines zytoimmunologischen Monitorings zur postoperativen Überwachung herztransplantierten Patienten

Als Modell wurde die heterotope intrathorakale Herztransplantation gewählt. Es wurden 7 allogene und 8 xenogene Herztransplantationen durchgeführt. Die Immunsuppression erfolgte mit Ciclosporin und Prednison. Die postoperative Überwachung wurde mit Hilfe der Endomyokardbiopsie und zytoimmunologischen Parametern, die auf der Analyse von Leukozytensubpopulationen basieren, durchgeführt.

Die mittlere Überlebenszeit xenogener Transplantate war kürzer als die allogener, aber bedeutend länger als historische Kontrollen ohne Ciclosporintherapie. Fanden sich bei den allogenen Transplantaten nur zelluläre Abstoßungsreaktionen, traten bei den xenogenen Transplantaten auch humorale Abstoßungsmechanismen auf. Die humoral bedingte Transplantatreaktion erwies sich als therapieresistent.

Untersuchungen der zirkulierenden Leukozyten und ihrer Subpopulationen erlaubte eine Differentialdiagnose von zellulärer Abstoßungsreaktion, bakterieller und viraler Infektion. Jede dieser entzündlich bedingten Reaktionen des Immunsystems zeichnete sich durch klar definierte Veränderungen des Blutbildes aus. Dieses zytoimmunologische Monitoring war in der Lage, auch ohne Endomyokardbiopsie die postoperative Verlaufskontrolle nach Herztransplantation ohne Fehldiagnose einer Abstoßungsreaktion zu über-

nehmen. Vergleicht man die Ergebnisse von Histologie und zytoimmunologischen Monitoring, erwies sich das Monitoring als ein hochsensitiver Test mit einer guten Vorhersagerichtigkeit für die Transplantatreaktion.

Ciclosporin ist in der Lage, auch über eine Inkompatibilitätsbarriere hinweg positiv auf die Überlebenszeit xenogener Herztransplantate einzuwirken. Den Wirkungen von Ciclosporin sind allerdings Grenzen gesetzt. Der klinische Einsatz eines xenogenen Transplantates auf Dauer scheint daher nicht gerechtfertigt, wohl aber die Überlegung, xenogene Organe vorübergehend bei der akuten Herzdekompensation einzusetzen, bis ein humanes Spenderherz gefunden ist. Mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings ergibt sich die Möglichkeit, den postoperativen Verlauf eines herztransplantierten Patienten lückenlos und zuverlässig zu verfolgen. Liefert das zytoimmunologische Monitoring bei pathologischem Befund die Indikation zur Endomyokardbiopsie, bedeutet dies eine Reduktion der routinemäßig durchgeführten Biopsien.

Worte des Dankes

Diese Promotionsarbeit wurde am Institut für chirurgische Forschung an der Universität München, Direktor Professor Dr.med.Dr.h.c. Walter Brendel, verfaßt.

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die bei den experimentellen Arbeiten assistierten und die zur Fertigstellung dieses Manuskriptes beitrugen.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr.med.Dr.h.c. Walter Brendel für die Aufnahme im Institut und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie Herrn Professor Dr.med.Dr.h.c. Werner Klinner für die großzügige Unterstützung.

Besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr.med.Dr.med.vet. Claus Hammer und Herrn Professor Dr.med. Bruno Reichart für die Betreuung meiner Arbeit und die zahlreichen Anregungen zur Ausarbeitung der Methodik als auch zur Vertiefung der Thematik.

An Herrn Professor Dr.med. M. Gokel, Pathologisches Institut der Universität München, ergeht mein Dank für die Auswertung der histologischen Befunde.

Herrn Professor Dr.med. B. Kemkes, Herrn Dr.med. Überfuhr, Herrn Dr.med. Welz und Herrn D. Peters, Herzchirurgische Klinik der Universität München, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Gedankt sei außerdem allen Kollegen und Mitarbeiter des Institutes für ihre verständnisvolle Unterstützung, im besonderen Fräulein Höbel und Fräulein Czapó.

Für die geduldige Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskriptes sei Frau Rieder mein herzlichster Dank gewidmet.

LEBENS LAUF

Name: Wolfgang Ertel
geb.: 12.06.1959
in: Weilheim/Bayern

Eltern: Ertel Erhart, Abteilungsdirektor
Ertel Anni, geb. Gröbl

Konfession: römisch-katholisch

Schul Ausbildung

1965 - 1969 Grundschule Weilheim
1969 - 1978 Gymnasium Weilheim
1978 Abitur

Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1978 - 1980 Vorklinik
Aug. 1980 Physikum
1980 - 1985 Klinik
Aug. 1981 1. Staatsexamen
März 1984 2. Staatsexamen
April 1985 3. Staatsexamen

Doktorarbeit

1981 - 1985 am Institut für Chirurgische Forschung,
 Klinikum Großhadern,
 (Leitung: Prof.Dr.Dr.h.c.W. Brendel)

4.Mai 1984 Philip Caves Gedächtnis-Preis, verliehen von
 International Society of Heart Transplantation

Seit 1.7.1985 Assistent der Chirurgischen Klinik und
Poliklinik des Klinikums Großhadern (Leitung: Prof.Dr.G.
Heberer)

MEMORANDUM

CONFIDENTIAL

1. The purpose of this memorandum is to provide information regarding the activities of the [redacted] in the [redacted] area. This information was obtained from a confidential source who has provided reliable information in the past.

2. The [redacted] has been observed in the [redacted] area on several occasions. It is believed that the [redacted] is engaged in activities which are detrimental to the [redacted] and its interests.

3. It is recommended that the [redacted] be kept under close surveillance. Any further information regarding the [redacted] should be reported immediately to the [redacted].

4. This memorandum is classified as [redacted] and should be handled accordingly.

5. The [redacted] is a [redacted] and should be handled accordingly. It is recommended that the [redacted] be kept under close surveillance. Any further information regarding the [redacted] should be reported immediately to the [redacted].



